

ANNÉE 1901

THÈSE

N°

101

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Jeudi 12 Décembre 1901, à 1 heure

PAR

A. SLATINÉANO

SEPTICÉMIE EXPÉRIMENTALE

PAR LE

COCCO-BACILLE DE PFEIFFER

ESSAIS D'IMMUNISATION

Président. M. CHANTEMESSE, *professeur.*

Juges..... { MM. BUDIN, *professeur.*
BONNAIRE, *agrégé.*
ACHARD, *agrégé.*

Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

LAVAL

IMPRIMERIE PARISIENNE

L. BARNÉOUD & C^{ie}

8, RUE RICORDAINE

1901

101

ANNÉE 1901

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Jeudi 12 Décembre 1901, à 1 heure

PAR

A. SLATINÉANO

SEPTICÉMIE EXPÉRIMENTALE

PAR LE

COCCO-BACILLE DE PFEIFFER

ESSAIS D'IMMUNISATION

Président. M. CHANTEMESSE, *professeur.*

Juges..... { MM. BUDIN, *professeur*
BONNAIRE, *agrégé.*
ACHARD, *agrégé.*

Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical.

LAVAL

IMPRIMERIE PARISIENNE

L. BARNÉOUD & C^{ie}

8, RUE RICORDAINE

1901



PRÉFACE

Il est un usage à la Faculté de médecine de Paris auquel nous autres étrangers, qui avons profité de l'hospitalité si large de la science française, ne voudrions certes pas nous soustraire. Aussi est-ce avec une reconnaissance émue que nous venons apporter ici nos hommages aux maîtres qui nous ont prodigué leur savoir et leur bienveillance. C'est un plaisir en même temps qu'un devoir d'adresser nos remerciements respectueux à MM. les professeurs Berger, Budin, Déjerine et Hayem et à M. le Dr Babinski, nos maîtres dans les hôpitaux.

Nous n'oublierons jamais l'accueil qui nous a été fait à l'*Institut Pasteur* et les obligations que nous devons à MM. Duclaux, Roux et Metchnikoff. C'est dans le laboratoire du professeur Metchnikoff, sous sa direction, après avoir été inspiré par lui, que ce travail a été élaboré. Je ne saurai jamais suffisamment assurer le savant maître de toute mon admiration et lui prouver assez ma profonde gratitude.

Je compte sur sa grande bienveillance pour accorder un peu d'indulgence à mon travail.

Que M. le professeur Chantemesse me permette également de le remercier de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de cette thèse.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

Découverte du microbe de la grippe

La grave épidémie de grippe qui sévit en Europe pendant les années 1889 et 1890 attira d'une façon toute particulière l'attention des médecins et des bactériologistes sur cette maladie. De tous les côtés des recherches furent commencées et poursuivies pour essayer d'en déterminer l'agent spécifique. Et pourtant un quart ou même un tiers des médecins (in Netter) niaient à cette époque la contagiosité de la grippe, mais la grande majorité suivait heureusement la voie ouverte par Pasteur et bientôt de nombreux travaux parurent sur cette question.

En 1890, Babès (1) (Wiener Klin. Woch) signala de nombreuses espèces microbiennes, sans insister particulièrement sur aucune d'entre elles. D'autres auteurs incriminèrent spécialement tantôt le streptocoque, tantôt le Friedlaender, mais les recherches poursuivies par Bouchard,

1. Babès : *Centrallblatt f. Bakt.* 1880. B. VIII, N^{os} 8-19.

Netter, Ménétrier, Leyden, Friedrich, démontrèrent que c'étaient là les hôtes habituels des voies respiratoires, qui par suite de circonstances spéciales avaient exalté leur virulence de sorte que Kühn et Weichselbaum eurent à se demander s'il y avait réellement un agent spécifique de la grippe et si l'épidémie n'était pas due tout simplement à l'exaltation de virulence des bactéries ordinaires.

Aussi faut-il arriver au travail publié par Pfeiffer dans la *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (*Vorläufige Mittheilungen ueber den Erreger der Influenza*, n° 2, p. 28 1892) pour avoir une donnée précise. Dès 1890 Pfeiffer avait remarqué dans des crachats que Kirchner lui avait envoyés, la présence d'un petit cocco-bacille, qu'il étudia soigneusement et que plus tard (1892) il n'hésita pas à présenter comme l'agent spécifique de l'influenza.

R. Pfeiffer dans une série de quatre mémoires, dont deux en collaboration avec Beck (1), établit de main de maître l'individualité de son microbe, ses caractères morphologiques, ses conditions de vitalité et en donne la description suivante :

C'est un petit cocco-bacille, plus grêle que celui de la septicémie des souris, plus long que large ; (l'auteur insiste particulièrement sur ce fait que le microbe prend plutôt la forme bactérienne que la forme en coccus) il se colore mal par les couleurs ordinaires, mieux par le Ziehl dilué, et, caractère important, ne prend pas le Gram ; il n'a pas de capsule et est complètement immobile.

Les conditions dans lesquelles il se cultive sont remar-

1. Voir les quatre mémoires suivants :

I. Cité plus haut.

II.-III Pfeiffer und Beck, *Deutsche Med. Woch.* 1892, n° 21 et 1893 n° 34.

IV. Pfeiffer : *Die aetiologie der Infl.*, *Zeitschrift für Hyg.*, 1893.

quables et la découverte des procédés de culture met en évidence l'ingéniosité du savant bactériologiste.

Pfeiffer remarqua, en effet, que le microbe ensemencé poussait plus ou moins abondamment, mais tout repiquage était impossible. Il put se convaincre de cette façon qu'il était nécessaire d'ajouter quelque chose, une substance quelconque aux milieux habituels pour permettre la multiplication du microbe. Cette substance, c'était soit le *suc pulmonaire*, soit le *sang* ; il acquit bientôt la conviction que c'était surtout le sang qui était nécessaire et il obtint alors de belles cultures, faciles à repiquer, à la condition toutefois de faire les repiquages fréquemment, tous les 4 ou 5 jours, la vitalité du microbe s'épuisant rapidement. Le cocco-bacille de Pfeiffer cultive au bout de 24 heures et forme de belles colonies rondes, transparentes, à peine visibles, analogues aux gouttelettes de rosée ; ces colonies restent toujours isolées les unes des autres, jamais confluentes. Par une série d'expériences qui constituent une merveille de raisonnement déductif, l'auteur établit que la substance nécessaire à la vitalité du microbe est l'*hémoglobine*. L'origine de cette dernière importe peu, toutefois Pfeiffer accorde la préférence à celle du sang de pigeon. L'hémoglobine agit-elle comme corps oxydant ou bien par sa richesse en sels de fer ? Pfeiffer n'est pas parvenu à le savoir d'une façon certaine.

Quoi qu'il en soit, le microbe cultive bien sur les milieux sanglants à 37° ; les limites de sa vitalité varient entre 28° et 43° ; il est rigoureusement aérobie, très fragile et nécessite des repiquages fréquents ; il meurt rapidement dans l'eau vers la 32^e heure et résiste mal à la dessiccation, d'où impossibilité de la contagion par l'eau et par le sol, mais simplement de personne à personne.

Après avoir étudié son microbe dans les crachats des

grippés — il fait à cette occasion une remarquable étude sur la phagocytose — Pfeiffer nous fait part de ses expériences sur les animaux et finit son article par une petite étude sur le pseudo-bacille de l'Influenza, qui ressemble beaucoup au vrai, mais dont il diffère par le fait qu'il donne des formes filamenteuses.

Le travail de Pfeiffer, admirable de tous points, contient pourtant deux détails qui prêtent à la confusion :

1^o Après avoir admis que son cocco-bacille peut cultiver sur le pus bronchique qui est pourtant un milieu dépourvu d'hémoglobine, après avoir admis (à la suite de la communication de Kitasato qui obtint des cultures sur agar glyciné) la possibilité de trouver un milieu non sanglant sur lequel le microbe puisse prospérer, il insiste tellement sur la nécessité de l'hémoglobine (*nur auf Blutagar und Hämoglobin haltigen Nährboden*) que les auteurs qui ont étudié cette question à la suite de Pfeiffer, influencés par ses doctrines sont arrivés à des résultats contradictoires, de sorte que Meunier qui a certainement obtenu le cocco-bacille, affirme qu'il ne pousse *exclusivement* que sur milieux sanglants tandis que Elmassian a pu facilement cultiver ce même cocco-bacille de Meunier sur des milieux à ascite ;

2^o Le second point qui prête à confusion est son pseudo-bacille de l'influenza ; il a donné là une grande importance à une simple question de morphologie, or on sait combien les espèces microbiennes sont de mauvaises espèces (Metchnikoff) et leurs variétés de pires encore.

Presque en même temps que Pfeiffer, Canon (1) affirme avoir rencontré dans six cas sur vingt malades, le microbe dans le sang. Il le montra à Koch qui le reconnut. Dans le

1. Canon : *Deutsch. Med. Woch.*, 1892, nos 2 et 3.

numéro III de la même revue il nous donne son procédé de culture : agar glycérimé et sucré.

Kitasato (*Soc. médic. de la Charité*, Berlin) nous dit aussi qu'il l'a cultivé sur agar glycérimé et qu'il ne l'a jamais rencontré dans les crachats des phtisiques.

Babès (1) dans une série d'articles, réclame la priorité de la découverte du bacille de l'Influenza, et il est en effet indéniable qu'il fût l'un des premiers à l'entrevoir ; il semble toutefois qu'il a fait une confusion par la suite, car après avoir donné ses procédés de culture (agar glycérimé), il affirme que le microbe s'est montré pathogène pour le lapin, qui meurt de septicémie lorsqu'on lui inocule une culture *par les fosses nasales*, fait qui ne se produit jamais avec le b. de Pfeiffer.

Pareille erreur apparaît dans les travaux de Bombici (2), Bruschettini (3) et Klein (4). En particulier les figures qui accompagnent les articles de Bruschettini paraissent représenter des staphylocoques et des streptocoques. Quant à Klein il a obtenu un microbe qui se développe sur gélatine.

Chantemesse et Cornil (5) ont décrit un petit bacille à extrémités renflées, qu'ils ont trouvé dans le sang d'une enfant atteinte d'influenza. Le sang de cette enfant, injecté dans les veines d'un lapin, a provoqué une septicémie ; avec le sang de ce premier lapin on a pu en inoculer un second. Le microbe pousse sur bouillon et gélose sucrée.

Mais bientôt la découverte de Pfeiffer est confirmée de

1. Babès : *Central blatt für Bact.*, VIII (8-19) et *Deutsch. Med. Woch.* n° 6.

2. Bombici : *Rif. Med.*, 1892.

3. Bruschettini : *Rif. Med.* 1892-93. *Arch. per le scienze Med.* 1892 et *Deutsche Mediz. Woch.* 1893.

4. Klein : *Loc. Govern. Board* 1892 et *Britisch. Med. Journal*, 1892.

5. Chantemesse et Cornil. *Bulletin médical* (1892) n° 12.

tous côtés : en effet, Weichselbaum (1), Huber (2), Borkhardt (3), Pielicke (4), Voges (5), Meunier (6), Kruse et un grand nombre d'auteurs, la confirment et la complètent sur quelques points de détail.

Nous allons analyser la plupart des travaux importants :

Le procédé de culture de Pfeiffer qui se contentait du sang défibriné à la surface de la gélose fut modifié.

Voges reçoit dans de l'agar bouillant une solution d'hémoglobine et la laisse refroidir. Delius et Kolle emploient un procédé très commode pour avoir des cultures non souillées par le sang : dans la gélose préalablement fondue et refroidie à 45°, ils mettent du sang défibriné et laissent ensuite refroidir la gélose en position inclinée ; ils obtiennent, de la sorte, un milieu propre à la culture du bacille, dont la surface n'est pas souillée par le sang.

D'autres auteurs emploient l'hémoglobine du commerce (Huber) ou bien (Grassberger) l'hématogène du Dr Hommels.

Tous les bactériologistes insistent sur la nécessité de l'hémoglobine et cependant Elmassian d'un côté, Cantani de l'autre, travaillant chacun séparément, constatent que le cocco-bacille de Pfeiffer peut pousser même sur des milieux dépourvus d'hémoglobine pourvu toutefois qu'on lui fournisse une substance organique appropriée, à savoir *le liquide d'ascite*.

Ce fait bouleverse tellement les notions reçues jusqu'alors qu'Elmassian hésite à croire que c'est vraiment le bacille de

1. Weichselbaum : *Wiener Klin. Woch.*, 1892.

2. Huber : *Zeitsch. für Hyg.*, 1893.

3. Borkhardt : *Berlin. Klin. Woch.*, 1894.

4. Pielicke : *Berlin. Klin. Woch.*, 1894.

5. Voges : *Berlin Klin. Woch.* 1894, n° 38.

6. Meunier : *Archives Gén. de Médecine*. Deux articles, 1898.

l'influenza qu'il est en train de cultiver et pourtant Pfeiffer n'avait pas nié la possibilité du fait, pour une excellente raison : c'est qu'il n'avait jamais essayé les milieux à ascite, il avait simplement affirmé que son microbe ne poussait pas sur le sérum de cheval. Elmassian (1) cultiva sur les mêmes milieux le microbe de Meunier.

Rosenthal (*Thèse de Paris*, 1900) vérifie ce fait et Cantani (*Centralblatt für Bakt.*, Bd. XXII) établit qu'on peut aussi le cultiver sur le sperme.

Dans une série de recherches récentes (*Zeit. f. Hyg.*, 1901) Cantani arrive à cultiver le microbe de Pfeiffer sur : bouillon-sérum, agar-sérum (humain ou animal) sur liquide d'ascite, sur milieu de Wertheimer, sur bile humaine, sur jaune d'œuf (Nasstinkoff). Dans le même travail, il établit qu'il se cultive aussi sur : albumine d'œuf, jaune d'œuf et agar, sérum-albumine, hémoglobine et oxy-hémoglobine (maximum) sur globuline du sang, globuline du sérum, cholestérine, mucine de la bile, protalbumose, disalbumose, protagon.

Il ne cultive pas sur : hématine, protéine, deuteralbumose, nutrose et somatose. Il arrive finalement à la conclusion suivante : que la substance absolument nécessaire au microbe pour se développer, n'est pas l'hémoglobine comme Pfeiffer le croyait, mais bien la globuline.

Malgré la compétence toute spéciale de Cantani qui étu-

1. Le mémoire d'Elmassian n'est pas dépourvu d'une certaine confusion. Il dit par exemple que son microbe pousse sur agar-sérum (sans spécifier quel sérum) et agar-ascite. Quand on cherche à savoir comment il préparait ses milieux, on voit qu'il employait sous le nom générique d'agar-sérum, de l'agar mélangé à de la sérosité d'ascite, de kyste ovarien ou d'exsudat pleural. Or, ces liquides à composition variable diffèrent du sérum sanguin et ne méritent nullement le nom d'agar-sérum qu'il leur donne.

die depuis longtemps ce microbe, il est prudent d'attendre que ces résultats soient confirmés.

Comme nous l'avons dit, à la fin de son travail Pfeiffer a signalé un pseudo-bacille de l'influenza, ayant ceci de commun avec le vrai, qu'il avait besoin de l'hémoglobine pour se développer, mais qu'en culture, il donnait des formes longues ce qui le distinguait du bacille type.

Ces formes furent retrouvées par la plupart des auteurs ayant étudié la question : Klein, Borchkard, et Pielicke, qui signala la transformation des formes filamenteuses en formes typiques, et Lindenthal (1).

Meunier fit remarquer que ces formes apparaissent surtout dans les cultures vieilles de deux à trois jours. Delius et Kolle attribuèrent ces formations à la mauvaise qualité des milieux de culture. Mais il faut arriver à Grassberger (*Centr. f. Bakt.*, 98) qui étudia spécialement cette question des filaments dans les cultures des bacilles de l'influenza.

Grassberger exagéra l'idée de Pfeiffer, et sur une quarantaine de cas qu'il étudia, arriva à isoler deux types. Le type A (origine : grippe avec bronchite) qui répond à la description classique de Pfeiffer et Meunier (2) et le type B (origine grippe avec broncho-pneumonie, pleurésie et endocardite, remarquable par le nombre des filaments qu'il donne en culture. Mais ainsi que l'a fait remarquer Rosenthal, ces deux types ne présentent aucun caractère différentiel, quand on les examine sur des frottis d'organes. Grassberger ajoute aussi que dans les premières 48 heures il est impossible de différencier la forme A de la forme B. En somme cette distinction établie seulement sur l'aspect extérieur des microbes, paraît peu probable.

1. Lindenthal : *Wiener. Klin. Wochen.* 1897.

2. Meunier, *loc. cit.*

Rosenthal s'est attaché dans sa thèse à démontrer l'innéité de cette distinction. Il prouve qu'un même microbe placé dans des conditions variables (qu'il ne détermine d'ailleurs pas) donne tantôt des formes longues tantôt des formes courtes. Au surplus ce polymorphisme du microbe a été signalé par un grand nombre d'auteurs. Ainsi Meunier décrit outre les filaments, des formes en diplocoques, en pseudo-diplocoques (formes qu'on rencontre souvent dans l'organisme de l'animal) en streptocoques, ainsi que des formes renflées en massue en crosse ou en rosette.

Rosenthal à son tour insiste beaucoup sur ces différences morphologiques, signale qu'elles apparaissent, soit dans des vieilles cultures, soit lorsque le microbe trouve un milieu peu favorable pour se développer.

Le polymorphisme que le microbe présente en tant qu'individu, il le présente aussi en tant que colonie. Nous avons vu à propos des recherches de Pfeiffer (confirmées par Meunier, que les colonies forment des petites gouttelettes comme la rosée qu'on ne décèle qu'à la loupe ou au microscope. Or, Grassberger a signalé dans son étude (R. Grassberger, *Zeit. f. Hyg.*, 1897, Bd. XXV) que ces colonies deviennent considérables dans le voisinage d'autres microbes. Cette action favorisante en symbiose avec le Pfeiffer a été ensuite étudiée par Meunier sous le nom de satellitisme.

Grassberger, en outre, constate l'influence favorisante du staphylocoque blanc, doré ou citreus. La colonie de Pfeiffer développée dans le voisinage d'une colonie de staphylocoques acquiert des dimensions considérables, de 1 à 2 mm. Cette influence serait due à la diffusion dans le milieu sanglant des produits digestifs des staphylocoques.

Pour le prouver, Grassberger prend une culture de 24 h. de staphylocoques sur agar, coule cet agar dans une boîte de Petri qu'il ensanglante etensemence avec le b. de Pfeif-

fer ; il obtient ainsi des colonies géantes. Toutefois, lorsque le staphylocoque a été cultivé plus de 24 heures, les résultats sont inconstants. Le streptocoque et le pneumocoque jouissent aussi d'un rôle favorisant, mais moins que le staphylocoque..

D'autre part, Grassberger étudie l'influence de l'alcalinité du milieu et arrive au résultat suivant :

Le bacille en culture pure, n'atteint que les dimensions indiquées par Pfeiffer, celle d'une tête d'épingle ; les cultures sont sensibles à l'alcalinité que celle-ci soit supérieure ou inférieure à la normale (10 c. c. de NaOH normal pour 1000 d'agar). Les cultures mixtes (mêlées au staphylocoque) atteignent des dimensions extraordinaires, et elles se montrent très tolérantes pour des degrés divers d'alcalinité. Grassberger cherche à utiliser cette action favorisante du staphylocoque et essaye de cultiver le microbe de Pfeiffer sur des milieux à sel de fer, à sels biliaires et même sur des milieux ordinaires ; il n'arrive à obtenir des cultures que sur l'hémoglobine d'Hommels en solution à 10/0.

Citant le travail de Lindenthal dans la *Wiener Klinische Wochenschrift*, 1897 (travail dans lequel l'auteur fait remarquer que si on laisse les colonies de bacilles de Pfeiffer se développer à leur aise, elles s'aplâtissent, prennent une teinte bleuâtre, deviennent opaques même et peuvent atteindre 4 à 5 mm. de diamètre). Grassberger opine que cette observation s'applique, non pas à une culture pure, mais bien à une culture en symbiose. Enfin, à la fin de son travail, où, à côté d'excellentes choses, on trouve des détails fastidieux, Grassberger indique avec raison qu'il faut utiliser l'influence favorisante des staphylocoques, pour mettre en évidence les bacilles de Pfeiffer dans des cas difficiles.

Meunier (juin 98 Soc. de Biol.) reprend ces mêmes expé-

riences qu'il confirme en grande partie et y ajoute quelques faits nouveaux dont nous donnons le résumé :

1^o Certaines bactéries favorisent la végétation du b. de Pfeiffer en milieu sanglant ;

2^o Lorsqu'on surpique des staphylocoques sur des colonies du b. de Pfeiffer, celles-ci deviennent géantes et affectent une disposition satellitique ;

3^o L'action fertilisante sur le b. de Pfeiffer est exercée surtout par le staphylocoque et aussi, quoique à un degré moindre, par le bacille de la diphtérie, le bacille typhique, le *Bactérium coli*, le *prodigiosus* et les sarcines ;

4^o Conclusions identiques à celles de Grassberger sur l'alcalinité des milieux ;

5^o Une culture de staphylocoques en bouillon sanglant filtrée, exerce une action fertilisante sur le Pfeiffer, mais à un degré moindre que le staphylocoque vivant ;

6^o La propriété fertilisante des microbes qu'on surpique, est due à la modification chimique qu'ils impriment à l'hémoglobine du milieu.

Rosenthal répète ces expériences et il constate en outre :

a) Que le b. de Pfeiffer est auto-inoculable ;

b) Qu'on rencontre quelquefois des colonies bleuâtres (*Grassberger*, *Lindenthal*) tantôt pures, tantôt en symbiose. Il conseille de réensanglanter le milieu (pratique dangereuse, car on peut contaminer la culture) et de faire le surpiquage tardif.

Cantani junior (1) dans des recherches très intéressantes apporte des faits nouveaux. En ensemençant par mégarde des microbes de la diphtérie, sur un tube d'agar qui avait été ensemencé sept jours auparavant avec du bacille de Pfeiffer, il constate à sa grande surprise que ce dernier cul-

1. Cantani : *Zeitsch. f. Hyg.*, 1901.

tivait. Il obtint le même résultat avec le gonocoque (fait curieux puisque le gonocoque ne pousse pas sur agar ordinaire).

La culture paraît être assez abondante puisque Cantani marque par trois croix l'abondance de cette culture, le maximum étant de cinq croix. Il y a encore un fait intéressant à noter : c'est que la pseudo-diphthérie n'exerce aucune action fertilisante.

Cantani reprend ses expériences sur ascite-agar. L'influence est encore plus manifeste bien que moins intéressante. La diphthérie est marquée par quatre croix, le gonocoque par cinq croix (maximum) le staphylocoque seulement par deux. Enfin sur agar, glycérine, sang, l'influence de la symbiose est au maximum (cinq croix) pour la diphthérie et le gonocoque, tandis qu'elle n'est que de trois croix pour le staphylocoque.

Or ces résultats paraissent en contradiction avec les recherches de Grassberger, et de Meunier surtout, qui a essayé l'influence de la diphthérie et du staphylocoque sur le b. de Pfeiffer en milieu sanglant et a trouvé une différence en faveur du staphylocoque.

Ces recherches demandent donc des confirmations ultérieures.

Expériences sur les Animaux

Nous nous permettrons d'insister un peu plus longuement sur ce chapitre. C'est là-dessus en effet qu'ont porté la plupart de nos recherches et nous avons obtenu des résultats qui ne s'accordent pas avec ceux de nos prédécesseurs.

Pfeiffer expérimente sur des singes et des lapins. Le premier singe fut inoculé dans la trachée avec des crachats

d'influenza. Il mourut au bout de sept jours d'un abcès de la trachée.

Trois autres singes furent inoculés dans les poumons avec des cultures fraîches. Ils présentèrent de la fièvre, une toux légère puis une deffervescence en lysis. Au bout de 14 jours ils furent réinoculés ; la réaction fut plus faible.

Un quatrième fut inoculé dans les fosses nasales. Il eut de la fièvre pendant quatre ou cinq jours et tout rentra dans l'ordre.

Un cinquième singe reçut une dose considérable (3 cultures). Au bout de 48 heures il mourut en hypothermie. On trouva des bacilles en petit nombre dans le sang.

Chez le lapin par inoculation intra-veineuse d'une culture il obtint de la fièvre, de la dyspnée et de la parésie des membres. A des doses supérieures il obtient la mort en l'hypothermie.

Même résultat par inoculation intra-veineuse de microbes tués par le chloroforme.

Les souris sont tuées par 1/10 de la dose mortelle du lapin. Les cobayes résistent.

Pfeiffer (1) conclut que le bacille découvert par lui tue par intoxication et non par septicémie.

Des résultats identiques furent publiés par Voges (2), Canestrini (3), Pfuhl (4).

Cantani (5) cherche à tuer les animaux par injection intra-cérébrale. Après trépanation, il introduit dans la substance cérébrale du lapin 1/2 à 1 milligr. de culture pure de 24 h. L'animal présente d'abord une élévation de

1. Pfeiffer: *Zeits. f. Hyg.*, 1893.

2. Voges (*loc. cit.*).

3. Canestrini, in *Jacobson*.

4. Pfuhl. *Centr. f. Bakt.*, 1892.

5. Cantani, *Zeitsch. f. Hyg.* 1896. T. XXIII, p. 265.

température (42°) puis une baisse consécutive et meurt dans l'hypothermie. A l'autopsie on constate un exsudat sanguinolent dans le péritoine et de la congestion des viscères, pas de microbes ni dans le sang, ni dans les organes abdominaux ou thoraciques. Par contre, il y avait multiplication évidente du microbe dans le cerveau et dans la moelle.

Les cultures tuées par la chaleur et injectées dans les mêmes conditions à des doses légèrement supérieures 4-6 mill. donnent les mêmes résultats.

Par passage de cerveau à cerveau Cantani cherche à exalter la virulence de son microbe. Au bout du 5^e passage il l'isole et constate que sa virulence a augmenté. Dans une autre série d'expériences, il injecte dans le péritoine des cobayes l'émulsion d'un cerveau provenant d'un animal tue par injection intra-cérébrale et le cobaye meurt. Il considère ceci comme une exaltation de virulence provoquée par l'adjonction d'un bon milieu de culture dans le corps même de l'animal réfractaire. Or il est évident que cette interprétation est erronée : la substance cérébrale dont il additionne les microbes, empêche par sa présence la phagocytose de ceux-ci et leur permet de pulluler tant au moins pendant les premières heures. En somme, il réalise l'expérience de Vaillard lorsque celui-ci additionne de sable ou de gélose les spores du tétanos.

L. Martin *Soc. de Biol.* 1900 a réussi à tuer les cobayes par des injections dans le liquide céphalo-rachidien. Mais lorsqu'il essaya L. Martin et Dujardin-Beaumetz, communication orale de faire des passages de cerveau à cerveau il ne put pas dépasser le 4^e ou 5^e passage.

Belius et Kalle *Zeitch. f. Hyg.* (B. XXIV, 1897), ont expérimenté surtout sur des cobayes. A doses mortelles le cobaye succombait en hypothermie en 12 ou 48 heures.

A doses supérieures il succombait plus rapidement toujours en hypothermie. A doses inférieures à la dose mortelle après une hypothermie passagère, l'animal présentait une élévation de température et tout rentrait dans l'ordre.

Chez les cobayes qui avaient succombé, on constatait à l'autopsie une péritonite intense avec multiplication des bacilles dans la cavité péritonéale. Jamais on n'en trouvait dans le sang, sauf dans un cas exceptionnel relatif à un mouton injecté par des doses énormes de cultures.

Le microbe de Delius et Kolle est très virulent. Il tue habituellement à petites doses, 1/4 de culture suffit, quelquefois moins (1/20). Toutefois la virulence du microbe puisqu'elle n'est pas entretenue par des passages, baisse rapidement.

Delius et Kolle ont pu faire mourir des animaux par des cultures filtrées ou tuées. Huit c. c. d'une culture âgée de 3 à 5 jours en bouillon sanglant, filtrée et injectée dans le péritoine tue de petits cobayes de 250 gr.

Des doses un peu inférieures de 5 à 8 c. c. de microbes cultivés en bouillon sanglant et tués par la chaleur à 56° les tue également.

Toutes ces recherches cadrent avec les nôtres.

Nous ne pouvons pas en dire autant sur les recherches des mêmes auteurs sur l'immunité.

Recherches de Meunier (Arch. de Méd. gén. 1897). — La grenouille, le pigeon, la souris, le cobaye sont réfractaires. Le lapin seul donne des résultats positifs.

Il obtient même dans deux cas (I et III^e lapin) une véritable septicémie à bacilles de Pfeiffer.

Elmassian (Annal. Pasteur, 1900). — Chez le pigeon, la souris, il n'obtient rien.

Le lapin meurt de cachexie lente sans septicémie.

Des jeunes cobayes injectés dans la cavité péritonéale

meurent en 24 h. par péritonite généralisée avec exsudats fibrineux et bacilles multiples. On note aussi de la pleurésie et de la péricardite. Le sang du cœur donne de nombreuses colonies, toutefois il n'est pas possible de faire des inoculations en série (!)

Les recherches qui vont suivre ont pour point de départ le travail de Grassberger sur *l'influence favorisante de la symbiose sur le développement du microbe*.

Rosenthal (*Thèse de Paris* 1900 et *Presse Méd.* 1^{er} mai 1901). — Ses résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

Un lapin injecté de b. de Pfeiffer et de méningocoque meurt de cachexie.

Une souris injectée de b. de Pfeiffer et de pneumocoque meurt en 24 h. de sept. Pneum.

Un lapin injecté de b. de Pfeiffer et de staphylocoque dans les veines meurt de septicémie.

Un lapin injecté de b. de Pfeiffer et de staphylocoque dans le poumon meurt soit rapidement avec de la septicémie due au b. de Pfeiffer, soit lentement de toxhémie.

Une souris inoculée sous la peau meurt soit de septicémie, soit de cachexie.

Kamen (*Centr. für, Bakt*), 1901, n° 8. — Avec un microbe de Pfeiffer isolé dans un cas d'angine pseudo-membraneuse où il se trouvait associé au streptocoque, il fit avec les deux microbes les expériences suivantes : il expérimente sur dix souris le b. de Pfeiffer isolé qu'il injecte en culture pure dans le péritoine ce qui donne un résultat négatif.

Même résultat négatif en injectant le streptocoque isolé chez une autre souris.

Mais en injectant à une troisième souris, 1/4 de c.c. d'une culture en symbiose, d'influenza et de streptocoque,

la souris succombe. Le sang du cœur ensemencé donne du streptocoque et de nombreuses colonies d'influenza.

Jacobson (*Soc. de Biologie* 1901 et *Arch. de Méd. Exp.* 1901, n° 4. *Proca in Jacobson*). Les expériences de Proca datent de 1899.

Il injecte dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin de 1840 gr., un c. c. de bouillon sanglant où a poussé en symbiose le streptocoque et le b. de Pfeiffer. Mort en 12 heures. A l'autopsie on ensemence le foie, la rate et le sang. — Les tubes ensemencés avec la rate et le foie donnent le b. de Pfeiffer pur. Les tubes ensemencés avec du sang du cœur donnent un résultat négatif. Pas de streptocoques dans les cultures.

D'autres lapins injectés dans les mêmes conditions avec du b. de Pfeiffer et du streptocoque en symbiose succombent au bout de 25 heures à 6 jours. Les ensemencements d'organes donnent du streptocoque pur sans b. de Pfeiffer.

Enfin le Pfeiffer injecté en symbiose avec le diplococcus catharralis dans la veine de l'oreille, ne tue pas le lapin. Fait important, sur lequel insiste Jacobson dans son article : le streptocoque pur n'était pas virulent, l'association avec le b. de Pfeiffer exaltait sa virulence.

Jacobson reprend les expériences de Proca sur des lapins. Il injecte du b. de Pfeiffer et du streptocoque virulent, soit cultivés en symbiose, soit cultivés isolément. Ses résultats confirment ceux de Proca : il ne peut donner une septicémie de Pfeiffer, les animaux succombent à l'infection par le streptocoque seul. Chez la souris ses résultats sont encore plus intéressants : il injecte d'abord du streptocoque assez virulent (il tue à 1/10 ou 2/10 de culture) et du b. de Pfeiffer, cultivés en symbiose.

Les souris meurent de septicémie et le sang du cœurensemencé montre des streptocoques et du b. de Pfeiffer.

Il obtient les mêmes résultats en injectant en même temps du streptocoque et du b. de Pfeiffer cultivés isolément.

Mais ses résultats sont négatifs quand il injecte d'abord du streptocoque et ensuite du b. de Pfeiffer. L'ensemencement du sang du cœur donne du streptocoque.

Dans une série d'expériences il cherche à exalter la virulence du b. de Pfeiffer en l'injectant simultanément avec du streptocoque tué. Il arrive au bout de quatre passages à avoir une race virulente de b. de Pfeiffer qui tue la souris en 24 h. Le sang du cœurensemencé donne du b. de Pfeiffer pur.

Il refait la même chose, avec un microbe de Pfeiffer provenant d'un tuberculeux grippé. Il a le même résultat.

Il arrive donc à provoquer une septicémie expérimentale par le bacille de Pfeiffer chez la souris, en exaltant la virulence du microbe par inoculations en symbiose avec du streptocoque tué par la chaleur (58°).

A la fin de son travail, Jacobson cherche à trouver l'explication de l'exaltation de virulence dans les expériences antérieures de Grassberger et Meunier sur le satellitisme du microbe de Pfeiffer.

« Il se pourrait par exemple », dit-il, « que le streptocoque secrétât une hémolysine (fait probable si l'on tient compte des propriétés hémorragiques constatées par Proca et par nous), et qu'il rendît ainsi plus facile le développement du bacille de Pfeiffer, en mettant en liberté l'hémoglobine si favorable au développement de ce microbe. »

L'existence de l'hémolysine du streptocoque a été signalée depuis longtemps, par Bordet en particulier. Toutefois l'exaltation de virulence du microbe, ne nous paraît pas être due à ce fait.

Ainsi qu'on le verra plus loin, cette hémolysine ne favorise pas du tout, ni *in-vitro*, ni *in-vivo* la virulence du microbe de Pfeiffer.

Recherches du bacille de Pfeiffer chez l'homme

Ainsi que nous l'avons dit, à la suite de la découverte de Pfeiffer, les confirmations éclatent de toute part. On peut voir dans le travail de Meunier, le nombre considérable d'observations qui signalent chaque année la présence du microbe.

Pfeiffer les signale dans les crachats (il fait à cette occasion une excellente étude sur la phagocytose, et montre la présence des microbes à l'intérieur des phagocytes) et dans le poumon. Il les a vainement recherchés dans le sang.

Les recherches ultérieures montrent le bacille un peu partout. Meunier (1) le trouve 10 fois sur 11 dans la broncho-pneumonie infantile.

Letzerich (2) dans les séreuses, Meunier dans un épanchement séro-fibrineux, Pfeiffer, Beck, Netter dans des pleurésies purulentes.

On le remarque assez souvent dans les centres nerveux pour lesquels il marque une certaine prédilection, Canon, Pfuhl (3), Meunier, Pfuhl et Walter (4), Haedke (5), Slawyck l'ont signalé le plus souvent dans des cas graves dont quelques-uns avec généralisation.

D'ailleurs les cas de généralisations deviennent de plus en plus fréquents depuis que l'attention a été attirée sur ce

1. *Loc. cit.*

2. Letzerich in Widal : *Traité de Méd.*, t. II.

3. Pfuhl : *Zeit. f. Hyg.*, 97, B. XXXI et *Klin. Woch.*, 1892.

4. Pfuhl et Walter : *Deutsch. Med. Woch.*, n^{os} 6 et 7.

5. Haedke : *Münch. Med. Woch.*, 1897.

point. Outre les cas de Pfuhl, de Canon (1), Pfuhl et Walter, Meunier l'a trouvé quatre fois pendant la vie, trois fois après la mort. Von Nauwerk, Fränkel, Slawyck (2), Rosenthal (3) ; Slawyck dans son travail (1899) cite une vingtaine de cas.

Enfin Meunier l'a trouvé aussi dans un cas d'ostéo-périostite.

On a constaté la présence du bacille de Pfeiffer non seulement dans les cas de grippe ou de ses complications, mais même dans des affections n'ayant avec la grippe que des relations lointaines ou même nulles, que dans la phtisie caverneuse et dans la coqueluche.

De là à aller nier toute spécificité au bacille de Pfeiffer il n'y avait qu'un pas. On l'a franchi et dans un récent article Rosenthal (*Press. Médic.* 1^{er} mai) résume tous les griefs qu'on lui reproche, et qui peuvent se résumer de la façon suivante :

1. *Il y a un microbe de Pfeiffer sans grippe* ; à ceci il est facile de répondre : il y a des pneumocoques sans pneumonies, des streptocoques sans septicémie et d'autres cas analogues. Qu'on trouve du microbe de Pfeiffer même à l'état saprophyte (chose qui n'a pas été faite encore), chez des hommes qui n'ont jamais souffert d'influenza, cela ne prouve rien quant à la spécificité. Il n'y a en effet rien de plus variable que la virulence d'un microbe.

2. *Grippe sans microbes de Pfeiffer*. — Ceci n'a rien d'étonnant et est encore plus explicable. Quand on connaît les modalités cliniques de la grippe, on voit que dans les cadres de la maladie il y a place pour plusieurs microbes (4).

1. Canon : *Virchow's Archiv.*, 1893.

2. Slawyck : *Zeit. für Hyg.*, 1899.

3. Rosenthal : *Loc. cit.*

4. Un grand nombre de cliniciens considèrent l'infection par le b. de Pfeiffer comme préparatoire à l'exaltation de virulence des microbes ordinaires qui passent au premier plan.

Seulement les exemples apportés par Rosenthal sont vraiment malheureux. Il cite un cas de pneumonie lobaire suivi d'otite qui cliniquement n'était pas la grippe, mais qui à l'examen bactériologique montra du pneumocoque et du microbe de Pfeiffer. Et dans ce cas Rosenthal n'hésite pas d'affirmer que c'est la clinique qui a raison et la bactériologie qui a tort. De même, il cite quatre autres cas : bronchite, broncho-pneumonie, et deux pneumonies dont une chez un alcoolique, qui furent provoqués les deux premières par l'enterocoque de Thiercelin, les deux dernières par le pneumocoque et il leur reproche de n'être pas grippales ? Pourquoi veut-il qu'elles soient grippales ?

Un certain nombre d'auteurs, Delius et Kolle, Cantani ont injecté des cultures tuées pas la chaleur à 58° sous la peau d'hommes de bonne volonté. Il y a eu de la fièvre et des phénomènes de dépression nerveuse. Nous étions tenté d'accorder une importance considérable à ces expériences. Mais M. Metchnikoff nous a fait remarquer que des microbes vulgaires comme le *Prodigiosus* tué par la chaleur produisent le même effet.

3. *Que les bacilles de Pfeiffer ne produisent pas une infection spécifique.* — Dans ce cas ils ne feraient que répondre trop aux modalités de la maladie. A une maladie comme la grippe où tout varie, doit forcément correspondre un microbe à tout faire. Car vraiment qu'y a-t-il de commun entre la forme nerveuse de la grippe, telle que Marty l'a étudiée, et la forme pulmonaire ou la forme gastrique qu'on fait rentrer dans le cadre de la grippe parce qu'on ne sait où la mettre, et qui ressemble beaucoup à une intoxication par le colli-bacille.

D'ailleurs la question est loin d'être résolue comme le croit Rosenthal. Wasseman a constaté lors de l'épidémie récente qu'on a toujours trouvé le microbe de Pfeiffer, mais

seulement au début (1) ; qu'il disparaissait ensuite faisant place à d'autres microbes et que de plus cette disparition entraînait un pronostic défavorable par suite des phénomènes d'intoxication consécutifs. Il établit, en se basant sur les travaux de Koch et de Dönitz un rapport étroit entre la disparition rapide du bacille de l'influenza dans des cas d'épidémie et un certain degré d'immunisation anti-bactérienne, mais non anti-toxique. Quoi qu'il en soit la question est loin d'être résolue. Elle demande de nouvelles et de longues recherches pour établir ou pour détruire la relation entre la grippe et l'influenza. Jusqu'à preuve du contraire, nous continuons à considérer le bacille de Pfeiffer comme le bacille de l'influenza. En ceci nous ne faisons que suivre la grande majorité des classiques. M. Widal dans son article grippe du *Traité de Médecine* 1899 n'émet aucun doute sur la spécificité du bacille.

Essais d'immunisation

Ces essais sont tous contenus dans le mémoire de Delius et Kolle.

Les résultats auxquels ces auteurs sont arrivés sont tout à fait opposés aux nôtres. Ils n'ont pu immuniser des animaux, ni par voie active, ni par voie passive.

Pour l'*Immunité active*, ils injectent à un cobaye du poids de 420 gr., 1/30 de culture sur agar. Ils poursuivent cette injection toutes les semaines par des doses successivement progressives et au bout de la 5^e semaine l'animal meurt à la suite d'une injection de 1/5 de culture, bien qu'il ait augmenté de poids (430 gr.).

1. Wasserman (*Deutsch. Med. Woch.*) 1900 juillet.

On serait tenté de croire à un commencement d'immunisation. Mais les auteurs ont placé en regard du tableau précédent, un autre tableau, où par des injections de vibrion cholérique à doses progressives ils immunisent un cobaye. A la 4^e semaine ils remplacent le v. cholérique par le bacille de Pfeiffer à la dose de 1/5 de cultures et l'animal meurt. Cette expérience prouve tout au plus que l'immunisation par le vibrion cholérique est impuissante à préserver l'animal de l'infection par le b. de Pfeiffer, chose dont on se doutait déjà. Mais elle ne prouve pas du tout qu'il n'y ait pas d'immunisation active.

Des essais d'immunisation par des cultures tuées par la chaleur échouent également : l'animal meurt à la suite de l'injection de 60 cultures tuées à 58° (dose ultime).

Immunisation passive. — Les essais suivants ont donné le même résultat négatif : soit que le sérum ait été injecté en même temps que les microbes (inject. intra-péritonéale) soit qu'il ait été injecté préventivement 24 heures d'avance dans le tissu sous-cutané).

Sérum de cobaye. — Chez le cobaye :

Sér. Cob. immunisé

0,1 c. c. ou 0,3,	sérum C. im. + 1/10 cul. sur agar.	Tue
0,5 » ou 0,7, »	» + » »	» Préserve

Sér. Cob. Normal

Même quant. S. Cob. N. + 1 1/10, cult.	= Tue
» » » + 1 1/10, cult.	= Préserve

Par conséquent, que le cobaye soit immunisé ou non, il fournit le même sérum ; il préserve à 0,5 et tue à 0,3 c. c.

Sérum de lapin immunisé. — Essai sur le cobaye :

0,1, 0,2, 0,3 ou 0,5 + 1/10 cult. pur, agar.	Tue
0,7 « + » » » »	» Préserve

Sérum de lapin normal. — Même résultat.

Delius et Kolle immunisent un chien. L'immunisation se fait lentement. Pendant 8 mois ils arrivent à injecter des doses énormes : 900 c. c. de bouillon pour l'injection finale.

Un quinzième de culture sur agar additionnée de 0,01 ou 0,1 c. c. de sérum de chien immunisé injecté chez un cobaye le tue. Mais 0,3 ou 0,5 de sérum additionné à la même quantité de microbes le préserve.

Le résultat est absolument identique avec le sérum d'un chien normal.

Après de nouveaux essais pour immuniser une chèvre, un mouton, le résultat reste le même.

Les auteurs prélèvent le sérum d'un homme convalescent de fièvre, et celui d'un autre à qui on a fait l'injection de 2 mmg. de culture tués par la chaleur à 58°. Le sérum de ces hommes est tout aussi peu préventif que le sérum d'un homme normal.

A la suite de ce long exposé nous ferons remarquer que si les observations de Delius et Kolle paraissent être très bien conduites, très minutieuses, elles n'échappent pas, justement par l'excès de cette minutie, à la critique.

Ainsi, on voit dans tous leurs tableaux que lorsque 0,3 c. c. de *sérum immunisant* injecté en même temps qu'une dose mortelle de microbes ne préserve pas l'animal de la mort, la même quantité de *sérum normal* a absolument le même effet.

Par contre, lorsque 0,5 c. c. de sérum immunisant préserve l'animal de la mort provoquée par une dose mortelle de microbes, la même dose, 0,5 de sérum normal, a le même effet.

Par conséquent, 0,3 de sérum normal de lapin ou de cobaye permet aux microbes de tuer l'animal et 0,5 du même sérum normal l'empêche ?!

Ces phénomènes sont par trop mathématiques pour des phénomènes biologiques. Dans les expériences que l'on fait journellement par les injections des animaux, on travaille avec une inconnue — inconnue qui est l'organisme animal, dont les variations de résistance nous échappent — et les résultats ne se présentent jamais avec cette belle ordonnance. Nous réservons donc toute notre admiration à ces cobayes qui injectés par 0,5 c. c. de sérum normal de lapin résistent à la dose mortelle — tandis que leurs collègues, moins complaisants — meurent bien qu'injectés avec 0,3 c. c. du même sérum normal.

D'ailleurs, nous ne voyons pas du tout pourquoi Delius et Kolle ont échoué. Les quantités énormes de cultures qu'ils finissent par injecter, soit 118 cultures chez un lapin, 900 c. c. de bouillon sanglant chez un chien, 150 c. c. chez la chèvre, doivent finir par former un anti-corps, même si le microbe est peu virulent.

Depuis les recherches de Bordet nous savons que outre les microbes, de nombreuses substances telles que le lait, les globules du sang, les extraits d'organes forment des anti-corps.

Pourquoi le microbe de Pfeiffer ferait-il exception ?

DEUXIÈME PARTIE

Recherches personnelles

a) Origine du Microbe. — Nous avons prélevé plusieurs échantillons de microbes de sources diverses ainsi qu'on va le voir :

I. Le microbe avec lequel nous avons fait toutes nos expériences provient d'un homme de 57 ans, professeur, très vigoureux, qui à la suite d'un cours très fatigant de plusieurs jours, présenta un peu d'enrouement et une légère céphalalgie. Pas de phénomènes pulmonaires ni gastriques. Pas de fièvre. Pouls légèrement accéléré ; 90 pulsations à la minute. Il ne tousse pas, mais après un effort expectorant, il amène l'expulsion de crachats dans lesquels les premiers jours on constate la présence du pneumocoque. Ce n'est que les jours suivants qu'on constate la présence des microbes de Pfeiffer, assez abondants, la plupart libres, quelques-uns intra-cellulaires. Nous n'avons pas poursuivi l'examen systématique des crachats pour voir pendant combien de jours le microbe persistait encore. Cette grippe a été très bénigne. Nous désignerons le microbe isolé des crachats de ce malade sous les initiales : M. M.

II. *Cas.* — Bronchite capillaire chez une femme âgée de 28 ans, domestique chez un marchand de vins. Elle fatiguait beaucoup, se sentait malade depuis longtemps mais ne se décide à entrer à l'hôpital qu'au dernier moment. Des petits râles fins disséminés dans la poitrine masquent les sommets qu'on soupçonne suspects. Respiration fréquente, 40 à la minute. Pouls à 120 avec des intermittences. Bruits du cœur mal frappés avec une certaine tendance au bruit du galop.

Albumine dans les urines.

Les crachats sont verdâtres et spumeux : à l'examen, des b. de Pfeiffer presque purs, la plupart libres. A l'intérieur des microbes leucocytes on les devine plutôt qu'on ne les voit.

On ponctionne la veine médiane basilique et on fait un ensemencement avec le sang, ensemencement qui reste stérile.

• Deux jours après son entrée à l'hôpital la malade meurt avec une cyanose intense.

Le sang du cœur ensemencé douze heures après la mort (sang du cœur retiré par un trocart) ne donne rien. A l'autopsie on constate des lésions des deux sommets et du pus dans l'un des reins.

L'ensemencement du poumon donne du b. de Pfeiffer, du staphylocoque, du pneumocoque, du coli bacille et d'autres microbes indéterminés.

La Rate ensemencée nous donne des staphylocoques et du coli-bacille.

Le sang ensemencé, après l'autopsie, nous donne du coli-bacille pur.

La race de microbe provenant des crachats de cette malade est désignée par l'initiale L.

III. *Cas.* — Malade de 25 ans, souffrant depuis trois se-

maines. Amené mourant à l'hôpital, on constate un état d'hébétude ; le malade répond mal aux questions. Le regard perdu dans le vide, il n'a pas conscience de ce qui se passe autour de lui. Il a les narines fuligineuses, les lèvres rôties, la langue blanche, jaunâtre, recouverte d'un épais enduit. Du pus s'écoule par l'oreille droite. Dans la poitrine on constate de petits foyers disséminés de râles sous-crépitants. La respiration est stertoreuse. Les bruits du cœur sont sourds, irréguliers et très lents. Pouls très lent (22 à la minute) température 39°. Le pouls nous fait faire le diagnostic d'abcès du cerveau, diagnostic justifié à l'autopsie qu'on fit le sur-lendemain. Avec de la bave qui s'écoulait de sa bouche (pendant qu'il était vivant encore) on avait ensemencé plusieurs tubes d'agar sanglant. A côté de nombreuses impuretés on observe quelques colonies petites, transparentes, qu'on isole et qui présentent les caractères de bacille de Pfeiffer. A l'autopsie : on ensemence le sang du cœur, le poumon, l'abcès du cerveau, le liquide céphalorachidien très abondant et purulent. Malheureusement tous nos tubes (nous en avions employé plus de trente) furent tellement envahis par le coli-bacille qu'ils ne nous furent d'aucune utilité. On sait en effet que l'agar sanglant se prête si bien à la culture du coli-bacille que celui-ci couvre au bout de 24 heures la surface du tube.

IV. *Cas.* — Une autre race de microbe de Pfeiffer fût isolée des crachats que notre ami le docteur Charcot nous apporta. Ces crachats provenaient d'une jeune fille qui souffrait d'une grippe avec pneumonie et qui était gravement malade. Ils étaient très riches en microbes de Pfeiffer et en pneumocoques. Cette jeune fille fut reprise au bout d'une année des mêmes symptômes. Dans ses crachats on pût constater la même association microbienne.

Cette race de microbes, remarquable par la stabilité de sa forme, nous la désignons sous la dénomination de race Ch.

V. *Cas.* — Une cinquième race fut isolée — beaucoup plus tard — (une année après) dans les crachats du fils de notre ami le docteur Tarassewitch, qui nous communiqua obligamment son observation.

L'enfant âgé de quatre ans et demie est pris brusquement d'un rhume assez marqué, avec rougeur de la gorge et toux laryngée. Vers le 3^e jour ces phénomènes augmentent la fièvre atteint 39° 5, il y a du larmoiement, de la photophobie, toux fréquente. Rien à l'auscultation. Ces symptômes s'amendent vers le 6^e jour mais laissent une convalescence assez longue.

Les microbes ont été isolés dans les mucosités enlevées de la gorge. Il a été virulent pour le cobaye qu'il a tué en 3 jours avec des microbes dans le sang.

Milieux de culture

D'après ce qui précède on a pu voir que tous nos microbes proviennent des crachats. Nous choisissons la partie grumeleuse des crachats ; nous lavions cette partie dans un peu de bouillon où nous l'écrasions avec la grosse spatule de platine et nous ensemencions ensuite avec cette grosse spatule en faisant des stries parallèles. Nous ensemencions à la fois 8 à 10 tubes de gélose sanglante sans reprise. Les premiers tubes sont généralement inutilisables, ce sont les derniers seulement qu'on peut utiliser et qui servent à isoler le microbe.

Nous allons maintenant donner quelques détails sur le milieu de culture. Nous nous servons de gélose et de sang

de pigeon. Le sang de pigeon est tantôt mélangé avec la gélose d'abord fondue et refroidie à 45°, suivant la technique de Delius et Kolle qui les premiers ont signalé ce procédé, tantôt il est répandu en surface sur des tubes de gélose inclinée. La méthode de Delius et Kolle a l'avantage de donner une surface unie sur laquelle le microbe pousse bien et où la moindre impureté est nettement visible. Mais elle a l'inconvénient d'être plus longue à préparer et de plus il nous a semblé que le microbe pousse moins bien que par l'autre méthode qui est l'ancienne méthode de Pfeiffer. Dans le cours de notre travail nous indiquerons toutes les fois que nous nous sommes servis de la méthode de Delius et de Kolle; quand il n'y a pas d'indication c'est que nous avons utilisé la méthode de Pfeiffer. Voici la façon dont on procède pour prélever le sang du pigeon. Nous avons essayé d'abord de prendre du sang de l'aile, le procédé a l'avantage d'être économique mais l'inconvénient de fournir peu de sang et quelquefois même du sang contaminé. Nous avons abandonné ce procédé et nous avons eu recours au procédé pratiqué par M. Latapie avec une merveilleuse adresse.

Voici en quoi il consiste : Le pigeon est fixé sur son appareil à fixation, le cou fortement tendu ; on enlève les plumes de la région cervicale antérieure on lave la peau à l'alcool-éther et on fait une incision médiane plus rapprochée de la tête du pigeon que du corps. On rejette sur le côté les conduits aériens et alimentaires, qu'on confie à un aide et avec une pince mousse on cherche les deux carotides qu'on aperçoit bientôt confondues avec les masses musculaires ; on isole une des carotides (elles sont très rapprochées l'une de l'autre) en ayant soin de la débarrasser de la couche celluleuse ; puis on met 2 fils autour de la carotide, l'un supérieur près de la tête qu'on noue et l'autre inférieur

du côté du corps dont on fait le nœud mais qu'on ne serre pas. Ainsi préparée on fixe la carotide en tirant sur les chefs du fil supérieur, avec le pouce et l'index de la main gauche (grand danger de rupture pour l'artère) et en l'appliquant sur le médius de la même main. Avec la main droite on introduit la pointe effilée d'un tube à essai stérile préparé d'avance.

Si la manœuvre est bien faite on voit le sang monter rapidement dans le tube. Lorsqu'on croit qu'on a épuisé l'animal (ou avant même si on veut le conserver) on serre le fil inférieur, on retire le tube on le passe rapidement à la flamme Bunsen et on verse son contenu dans un petit ballon, qui contient des perles de verre et qui a été préalablement stérilisé à 180°. On agite ce ballon pendant au moins une demi-heure pour le défibriner complètement.

Le sang de pigeon a une fâcheuse tendance à la coagulation, il faut donc le secouer énergiquement tout en évitant de toucher le coton qui ferme l'extrémité supérieure du ballon. Le sang ainsi défibriné est distribué ensuite dans des tubes de gélose inclinés fraîchement préparés.

On distribue le sang largement de façon à former une véritable nappe sanglante à la surface de la gélose ; si le sang est trop épais on l'additionne de bouillon ou d'eau physiologique pour le diluer un peu. Nous n'avons jamais fait plus de 80 tubes avec tout le sang d'un pigeon. On met des capuchons aux tubes de gélose ainsi ensanglantés, on les couche sur un plan incliné de façon à distribuer également le sang sur toute la surface de la gélose, et ainsi placés on les laisse à l'étuve pendant au moins 24 heures. Les tubes sont ensuite retirés, examinés un à un (on prélève même un échantillon sur lamelle qu'on examine au microscope) et on les garde debout à l'abri de la lumière dans

un endroit frais ; tels quels, ils sont prêts pour l'ensemencement.

Une des conditions nécessaires pour que le milieu soit bon est que le tube de gélose, ait au fond une quantité assez considérable de mélange d'eau de condensation et de sang.

Nous considérons cette quantité de liquide au fond du tube comme absolument indispensable à la culture du microbe, à la suite de l'ensemencement du sang du cœur d'un animal en expérience.

Si toutes ces précautions sont prises, on n'aura pas de déboires. Grâce à l'habileté technique de M. Latapie, depuis deux ans que nous travaillons ce sujet, nous n'avons eu de cultures contaminées qu'une seule fois.

Quant à la coloration du microbe, comme il se colore généralement assez mal, nous conseillons d'employer le Ziehl pour vérifier les cultures. Lorsqu'il s'agit d'un exsudat il faut recourir soit à la thionine soit au bleu de méthylène (les deux préparés par le procédé Borrel). Quand ces couleurs sont bien réussies elles donnent d'excellents résultats, pour les exsudats surtout.

Pour les coupes, nous avons employé habituellement le bleu Borrel suivi de tannin à 5 o/o pour éviter la décoloration de la pièce par l'alcool.

Toutefois les microbes se colorent mal sur les coupes et leur recherche demande beaucoup de temps.

Morphologie du microbe. Conditions de vie. Le microbe, isolé de ces divers cas dont on vient de parler, se présente sous l'aspect d'un cocco-bacille, à forme bacillaire prédominant sur la forme en coccus. Il est très petit, plus petit que le bacille du choléra des poules, et nous n'avons à ce sujet rien à ajouter à la description magistrale de Pfeiffer et de Meunier. Nous le reconnaissons au trois caractères

suivants : *c'est un cocco-bacille qui ne prend pas le Gram et qui ne pousse pas sur les milieux ordinaires*. C'est pourquoi nous conseillons ainsi que nous l'avons toujours fait de se servir des tubes témoins à gélose simple.

Toute erreur de technique est rapidement mise en évidence et on en est vite averti. Toutefois nous mettrons en garde les expérimentateurs contre le fait suivant : lorsqu'on ensemence un tube de gélose témoin, si on prélève avec le fil de platine une grande quantité de sang et de microbes cette quantité de sang est suffisante pour donner quelques rares colonies. Dans ce cas un réensemencement sur gélose simple permet de faire rapidement le diagnostic. Nous croyons devoir insister sur ceci : la gélose doit être humide. Il ne faut pas oublier que d'autres microbes tels que le pneumocoque ou le streptocoque de Marmoreck ne cultivent pas du tout si la surface de la gélose est trop sèche.

Nous avons essayé de cultiver les microbes de Pfeiffer de nos échantillons sur tous les milieux ordinaires : gélose simple avec ou sans peptone, gélose glycinée, bouillon ordinaire et bouillon de panse, gélatine, pomme de terre ordinaire ou glycinée ; il ne pousse sur aucuns de ces milieux. Il cultive bien sur gélose sang ou sang gélosé. La culture est assez abondante et atteint son maximum en 24 heures lorsqu'on fait l'ensemencement de culture à culture ; lorsqu'on ensemence du sang ou des organes d'animaux en expérience, il faut attendre 48 ou 72 heures.

Le microbe forme des colonies isolées, en gouttelettes de rosée ; ces gouttelettes sont quelquefois tellement petites qu'il faut une loupe pour les voir. Jamais ces colonies ne sont confluentes.

Il ne cultive pas sur gélatine sang à 24° et ne cultive bien qu'à 37°. La culture s'épuise rapidement, d'où nécessité de

repiquages fréquents. Le microbe meurt d'autant plus facilement que la gélose sanglante est plus ancienne et sa surface plus sèche. On peut le cultiver à des températures supérieures jusqu'à 42°. Nous avons essayé d'obtenir une race de microbes cultivée à 41° en faisant des repiquages journaliers. Au bout d'une semaine la culture n'était plus assez vivace pour être repiquée.

Le microbe vit aussi et se développe, mais d'une façon beaucoup moins vivace, sur un milieu composé de 2/3 de gélose et 1/3 ascite.

Toutefois toutes les ascites ne se prêtent pas à la culture. Le liquide d'ascite m'a été fourni obligeamment par Marmoreck à diverses reprises et provenait de diverses origines. Or le premier liquide fourni se prêtait à la culture du microbe, le deuxième et le troisième, bien que pris dans des conditions analogues, ne donnaient aucune culture. Tout récemment nous en avons repris et celui-ci se prêtait à la culture. Toutefois la culture sur gélose ascite n'a pas du tout l'abondance des cultures sur milieu sanglant.

Très souvent si on s'arrête à un examen superficiel de la surface du tube on serait tenté de croire que rien n'a poussé. Mais si on racle légèrement la surface du tube de gélose-ascite et si on porte sur lamelle, on constate que le microbe a cultivé, en donnant non plus des formes habituelles mais bien des formes d'involution. C'est ce fait probablement qui a induit en erreur un observateur aussi sagace que Meunier et nous croyons que le bacille de Pfeiffer cultive sur ascite pourvu qu'on l'essaie non pas sur un seul échantillon mais sur plusieurs. Nous avons essayé aussi de cultiver le microbe de Pfeiffer sur des milieux à serum : serum de cheval chauffé ou non, serum de bœuf, serum de lapin, de cobaye, de pigeon ; le microbe ne cultive sur aucun d'eux.

Incidemment, nous avons vérifié la justesse de l'observa-

tion de Grassberger et Meunier sur le satellitisme du microbe de Pfeiffer et du staphylocoque. Nous avons essayé ces derniers jours de vérifier l'assertion de Cantani : qu'on peut cultiver le microbe de Pfeiffer sur agar ordinaire pourvu qu'on le cultive en symbiose avec la diphtérie et le gonocoque.

Avec la diphtérie nous n'avons pu y arriver. Toutefois ceci pourrait être expliqué par le fait que la diphtérie ensemencée était de la race dite « américaine » à l'Institut Pasteur, cultivée depuis longtemps sur les milieux de Martin et qui ensemencée sur gélose simple a poussé d'une façon misérable. Des recherches ultérieures seront faites à ce sujet, car l'assertion de Cantani n'est nullement entamée par cette seule expérience.

Les divers spécimens de microbes que nous avons isolés présentent tous une remarquable unité si on les examine dans les cultures de 24 heures. C'est la culture désignée sous le nom de spécimen Ch. qui est la plus remarquable au point de vue de la fixité de la forme ; sur les cultures de 24 heures il n'y a pas de formes longues. Par contre la race L répond à la description donnée par Pfeiffer de son pseudo-bacille de l'influenza et à la race B de Grassberger. Si sur les cultures de 24 heures les formes filamenteuses sont rares, dans les vieilles cultures elles sont au contraire prédominantes.

Nous allons donner le tableau de ces deux formes types :

Le spécimen L. Sur gélose sanglante ce spécimen donne des formes usuelles au bout de 24 heures, mais au bout de 48 heures les formes filamenteuses deviennent plus nombreuses. Dans des cultures vieilles de huit jours (humides encore et repiquables) on constate des formes filamenteuses nombreuses, des formes renflées irrégulièrement, quelques-unes étranglées par leur milieu, d'autres et celles-là les plus

nombreuses prennent très mal le Ziehl et révèlent des vestiges de formes, enfin, il en est qui se colorent assez bien.

On voit aussi des formes rondes, en tout point analogues aux formes de digestion qu'on trouve à l'intérieur des leucocytes. On dirait qu'il se forme dans les vieilles cultures une substance qui digère les microbes.

Par contre sur le milieu Delius et Kolle modifié en ce sens que le sang de cobaye remplaçait le sang de pigeon, le spécimen L donnait des formes courtes presque trapues.

C'est surtout sur des milieux à ascite qu'on peut constater la tendance de ce microbe à donner des formes longues, elles sont visibles au bout de 24 heures et deviennent encore plus manifestes au bout de 48 heures.

Sur gélose sang de chien, ou sang de mouton, le microbe cultive mal sur le premier, et donne des formes d'involution sursang de mouton.

Le spécimen *Ch.* présente ceci de particulier qu'il a une tendance à la fixité de la forme. Le spécimen M. M. avec lequel on a fait toutes les expériences qui vont suivre présente la même tendance ; ce que nous disons de l'un est applicable à l'autre.

En culture de 24 heures ils présentent la forme classique. Il faut chercher de nombreux champs de microscope pour voir une forme longue qui peut d'ailleurs manquer. Mais sur des cultures plus vieilles de 2-3 jours les formes longues apparaissent, toutefois elles sont plus rares que dans le cas précédent. (*Cas L*) Sur des cultures vieilles de huit jours on constate de nombreuses formes d'involution, rondes ou trapues : les formes filamenteuses existent mais elles sont plus rares.

Sur gélose sang de chien ils ne poussent presque pas. Sur gélose sang de mouton ils cultivent en donnant des formes d'involution.

Sur *géluse ascite*, au bout de 24 heures ils donnent des formes gonflées. Au bout de 48 heures il y a quelques filaments mais incomparablement plus rares que pour la race précédente.

Sur *sang de cobaye gélusé* il y a prédominance de formes trapues très courtes, on dirait presque des cocci légèrement allongés.

Sur *géluse* additionnée de globules rouges de lapin hémolysés par du serum hémolytique de lapin, nous avons eu avec le même spécimen, des remarquables formes longues enchevêtrées à tel point que nous avons cru avoir affaire à une impureté. Ces formes tellement bizarres furent ensemencées sur milieu à sang de pigeon ordinaire et nous donnèrent des formes types ; nous conservons ces préparations éminemment instructives. Nous avons eu un moment posséder une méthode pour obtenir à volonté des formes longues, malheureusement de nouveaux essais faits sur le même milieu nous ont donné des formes longues mais pas aussi belles et aussi démonstratives que dans notre première expérience.

En faisant cultiver Ch. à 41°, nous avons eu d'abondantes formes filamenteuses ; nous avons essayé d'adapter le microbe à cette température, mais nous avons échoué. Au bout de 7 à 8 jours on ne pouvait plus le repiquer, quoique le repiquage eut été fait tous les jours.

En déposant une culture entière, émulsionnée par 2 c. c. de bouillon, à la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélatine et du sang de pigeon, et mise à l'étuve à 24°, le microbe ne se développe pas. Mais comme cette température ne doit pas lui convenir, avant de mourir il donne des formes longues qui se colorent mal.

En somme, d'après les expériences précédentes, on peut constater que le microbe se développe bien si on lui en

donne les moyens, et qu'il est assez fixe dans sa morphologie. Quand sa culture vieillit, où lorsqu'on le met dans de mauvaises conditions de vitalité, quand on lui donne parcimonieusement la substance dont il a besoin, (comme sur ascite) le microbe souffre et donne des formes d'involution. En ceci il ne fait qu'agir de la même façon que la plupart des microbes et sa morphologie est bien plus fixe que celle du vibron cholérique, par exemple, ou encore du spirobaccillus Cienkowski (Metchnikoff) dont les variétés vraiment extraordinaires n'ont déterminé personne à faire des races différentes. Nous arrivons donc à la même conclusion que Delius et Kolle, confirmée par Rosenthal : les formes filamenteuses, comme les autres formes d'involutions, ne sont autre chose que des formes de souffrance.

Nous voulons, avant de finir cette étude, montrer l'influence du milieu sur la virulence du microbe.

Expérience du 29 novembre. — On fait, à 6 heures du soir, l'expérience suivante : on prend 3 cobayes à peu près du même poids et chacun reçoit dans le péritoine des cultures de 24 heures, mais faites sur des milieux différents.

I) *Cob.*, 430 gr., reçoit à 6 heures du soir une culture de microbes sur agar sanglant. Le lendemain matin il est très souffrant.

Température

29 novembre. Avant l'injection . . .	38,7
30 novembre. A 9 heures du matin. . .	33,2
A midi	30,5
A 2 heures	mort

L'autopsie ne présente rien de particulier.

Le sangensemencé donne du b. de Pfeiffer pur.

II) *Cob.*, 450 gr., est inoculé en même temps que le précédent (à 6 heures du soir) avec une culture de 24 heures, mais suivant la méthode Delius et Kolle.

Température

29 novembre. Avant l'injection	39°
30 novembre. A 9 heures du matin	35°
A midi	33°
A 4 heures	32°
A 7 heures, mourant	29°

L'autopsie ne montre rien de particulier.

Le sangensemencé donne du b. de Pfeiffer pur.

III) *Cob.*, 400 gr., reçoit en même temps que les deux autres, à 6 heures du soir, deux cultures de Pfeiffer sur agar ascite.

Température

29 novembre. Avant l'injection	38°5
30 novembre. Matin	40°2
Soir	39°2
1 ^{er} décembre	39°
2 décembre	39°

Vivant, bien portant ; augmente de poids par la suite.

Cette expérience assez suggestive montre que les milieux à ascite, tout en permettant la culture du microbe, peuvent agir sur sa virulence en la diminuant.

D'ailleurs, d'après ce qui précède, on a pu voir que sa morphologie se ressentait déjà des milieux à ascite. Il n'y a rien d'étonnant à ce que sa virulence diminue également.

Nous avons cherché à compléter les recherches de Grassberger et de Meunier, en essayant de cultiver le microbe sur des milieux à toxines.

Ces recherches ne sont pas encore terminées, mais en cherchant à vérifier l'assertion de Jacobson sur l'influence de l'hémolysine du streptocoque nous sommes arrivés à des résultats contraires à son hypothèse.

Avec l'hémolysine du streptocoque, mise obligeamment à notre disposition par notre ami le Dr Besredka (Voir : Bordet et Besredka : *Annales de l'Institut Pasteur*, numéro Décembre 1901) nous avons fait les expériences suivantes :

1) Hémolysine additionnée aux milieux de culture ordinaires : agar et bouillon. On ensemence le b. de Pfeiffer et le résultat est nul.

2) Sang hémolysé par cette hémolysine additionnée aux milieux suivants : agar et bouillon.

Sur *agar-sang hémolysé* la culture de b. de Pfeiffer, pousse pauvrement et donne de nombreuses formes d'involution.

Sur *bouillon-sang hémolysé* on constate quelques flocons vers le fond du tube. Sur lamelle, on constate quelques très rares microbes.

3) Sur le *cobaye*. En injectant en même temps 2 c. c. de l'hémolysine et une culture non virulente du b. de Pfeiffer âgée de 24 heures, l'animal reste bien portant.

Expériences sur les animaux

Tous nos échantillons de microbe, que nous avons décrits plus haut, furent expérimentés sur les animaux de laboratoire. Nous avons d'abord inoculé par injection intra-veineuse dans la veine marginale de l'oreille du lapin. A part quelques lapins que nous avons tués par embolie, au moment de l'injection (nos cultures étaient faites sur gélose sanglante, nous ne connaissions pas la méthode

Delius et Kolle) le résultat fut nul. D'autres lapins furent inoculés par voie intra-péritonéale, tous survécurent.

Chez le cobaye nous avons essayé des injections intra-péritonéales et une seule fois une injection intra-veineuse dans la jugulaire. L'animal a survécu et a engraisé. Les injections intra-péritonéales n'ont pas donné de résultats. La destruction des microbes dans l'organisme n'a pas été suivie d'une façon systématique. Toutefois nous relevons sur notre carnet de notes que deux heures après l'injection tous les microbes étaient englobés, et quatre heures après il n'était plus possible de les apercevoir à l'intérieur des leucocytes.

L'exsudat était très purulent. Le cobaye avait été inoculé avec deux cultures d'agar sanglant.

Nous trouvons intéressant de relater l'expérience suivante :

I) *Cob.*, 390 gr. Température rectale 38°7.

Inoculé le matin à 10 heures avec 6 cultures d'agar sanglant émulsionnées dans 12 c. c. de bouillon qu'on injecte par voie intra-péritonéale. L'animal a l'air un peu souffrant. Il se débat comme s'il y avait quelque chose qui le brûlait.

La température est à midi . . .	39°
à 4 heures . . .	38°8
à 6 heures . . .	39°

Le lendemain matin l'animal a l'air très bien portant. Il mange avec appétit. Sa température est de 38°9 le matin, 38°9 le soir. Il continue à être bien portant les jours suivants.

Ces résultats du début ne furent guère encourageants.

D'après les conseils de M. Metchnikoff, nous essayâmes des injections intra-cérébrales de Cantani.

Voici la technique que nous avons suivie. Nous avons opéré sur des cobayes. On fait une petite incision verticale de la peau sur le front de l'animal. On écarte les lèvres de la plaie, et un peu en arrière de la ligne réunissant les deux commissures postérieures des yeux de l'animal, légèrement en dehors de la ligne médiane (pour éviter le sinus longitudinal) on porte la pointe d'un petit trépan. On obtient un orifice permettant l'introduction d'une fine aiguille.

On a préparé d'avance l'émulsion d'une culture Delius et Kolle, race M.M., âgée de 24 heures dans 2 c. c. de bouillon. Un 1/10 c. c. est introduit dans le cerveau. On étanche le sang, on rabat la peau sur l'orifice du trou et on fait un petit pansement au collodion. Un animal témoin est inoculé de la même façon mais seulement avec du bouillon.

Cob., 550 gr., inoculé dans le cerveau à 10 heures et demie du matin. Température avant l'injection 38°2. L'animal a l'air inquiet à la suite de l'injection. Immédiatement après l'injection il est tombé sur le flanc avec la tête raidie. Après quelques mouvements rapides des membres il cherche à se remettre debout. On le remet dans le panier et on le laisse tranquille. Vers midi il se relève, mais ses membres postérieurs n'ont pas l'air très solides. Sa température est de 39° ; vers 3 heures il est secoué de frémissements dans tout le corps. Sa température est de 40° ; jusqu'à 6 heures il présente fréquemment de véritables convulsions avec raideur de la tête. A 6 heures il tombe sur le flanc, sa température est à ce moment de 37°. Le lendemain matin on le retrouve mort, le ventre verdâtre.

A l'autopsie on constate que le péritoine contient une

faible quantité de liquide transparent, les vaisseaux mésentériques sont remplis de sang, il y a un peu de congestion des intestins ; le foie à l'aspect muscade, la rate est normale, le rein est congestionné, de même la capsule surrénale.

Le poumon a des taches ecchymotiques nombreuses, le sang est un peu coagulé, on ne peut en aspirer qu'une petite quantité par la pipette. On ensemente ce sang. On fait des préparations de l'exsudat péritonéal et des frottis d'organes. Dans l'exsudat péritonéal il y a des microbes étrangers (du coli-bacille) pas de traces de b. de Pfeiffer.

L'ouverture de la boîte crânienne nous montre le cerveau congestionné. On voit nettement la trace de la piqure. A ce niveau on brûle la surface du cerveau et on introduit une pipette flambée, on aspire un liquide louche et purulent et des débris de cerveau. On ensemente la culture sur milieux sanglants et on fait quelques préparations en écrasant la goutte de la pipette entre deux lames de verre qu'on étire. Ces préparations colorées avec le bleu Borrel nous montrent un grand nombre de microbes libres ; quelques-uns sont à l'intérieur de leucocytes, et il y a également de nombreux leucocytes et des cellules nerveuses écrasées. L'ensemencement du cerveau nous donne une culture abondante au bout de 24 heures. L'ensemencement du sang du cœur reste stérile. La même expérience fut répétée plusieurs fois (12 fois). Une seule fois l'ensemencement du sang du cœur nous donna un résultat positif. Vers le troisième jour après l'ensemencement du sang du cœur, nous pûmes voir des colonies se développer au fond du tube, là où se trouve l'eau de condensation. Ces colonies furent réensemencées et contrôlées. Avec une de ces cultures on réinoculait un cobaye dans le cerveau, un autre dans le péritoine ; ce dernier ne présenta rien, le premier mourut assez rapidement

(il fut injecté le soir à 5 heures, le lendemain à 9 heures 1/2 on le trouva mort) mais son sang resta stérile.

En répétant ces expériences nous ensemencâmes aussi la moëlle épinière. Voici de quelle façon : on découvre la colonne vertébrale dans la région cervicale et thoracique, après avoir enlevé les apophyses épineuses au niveau des dernières côtes, on s'arrête ; on brûle soigneusement l'orifice de la moelle dorsale au fer rouge ; on introduit une pipette et on aspire. La substance aspirée est répartie dans les tubes, avec le reste on fait des préparations.

Les tubes ensemencés donnent d'abondantes cultures, de même l'ensemencement du cerveau est positif.

Par conséquent on peut affirmer d'une façon générale que, en injectant des microbes vivants dans le cerveau, il y a pullulation de ces microbes dans la substance cérébrale. Le cerveau et la moelle ensemencés donnent des résultats positifs. Le sang ne nous a donné qu'une seule fois un résultat positif. Dans un seul cas l'ensemencement de la moelle et du cerveau est resté négatif. Les frottis du cerveau nous avaient montré une absence complète des microbes, on ne trouvait de microbes visibles ni en dehors, ni à l'intérieur des leucocytes, et les ensemencements de ce cerveau et de cette moelle sont restés stériles. Il est probable que dans ce cas, les microbes ont été complètement digérés par les leucocytes. Les microbes chauffés à 56° pendant une demi-heure donnent le même résultat

Cob. 350 gr. Inoculé avec 2/10 de c. c. d'émulsion de microbes Delius et Kolle dans 2 c. c., bouillon ordinaire à 11 du matin.

<i>Température</i> antérieure à l'inj.	38.5
à 1 h.	38.8
à 4 h.	39.9
à 6 h.	37.2

4 heures. . . .	37°
6 heures. . . .	35°

et mort à 6 heures 1/2,

A l'autopsie on constate un exsudat hémorragique dans le péritoine. Les vaisseaux mésentériques et l'intestin sont fortement congestionnés. Le foie a l'apparence du foie muscade, la rate est augmentée de volume. Les 2 reins sont fortement congestionnés. Du côté du rein gauche, énorme ecchymose sous péritonéale; le sang est coagulé. Le poumon montre des foyers de congestion disséminés sur toute l'étendue avec prédominance aux bases. Le sang du cœur est liquide. A l'ouverture du crâne on constate un fort œdème du cerveau. Le côté où on a fait l'injection est saillant. On fait pénétrer une pipette qui se remplit rapidement d'un liquide pas trop consistant et légèrement rougeâtre. La base du crâne est fortement hyperhémiee.

L'examen sur lamelle, de la sérosité cérébrale, montre des bacilles de Pfeiffer en culture pure en nombre considérable. L'examen de l'ecchymose et du sang ne présente rien de particulier. Onensemence ces diverses parties. Le cerveau et la moelleensemencés donnèrent une culture très abondante, le sang resta stérile. mais l'ecchymose sous péritonéale peri-rénale, donna quelques rares colonies microbiennes.

3° *Un troisième lapin* de 1500 gr. fut inoculé avec 5/10 d'une culture émulsionnée dans 2 c.c. de bouillon et chauffée à 56° pendant une demi-heure. L'animal inoculé le matin fut trouvé mort le lendemain. On n'a pas pris sa température. Les ensemencements du sang et du cerveau restèrent stériles.

Ces expériences montrent la toxicité spéciale des corps microbiens lorsqu'on les injecte dans le cerveau.

Nous avons essayé de savoir si des cultures filtrées ne

nous donneraient pas quelques résultats. Nous avons cultivé le b. de Pfeiffer sur un mélange de bouillon ordinaire additionné de son volume d'ascite et de quelques gouttes de sang de pigeon défibriné (séparé de sa fibrine) mis à la glace pendant une demi-heure puis à l'étuve pendant une heure pour faire éclater les globules. Sur ce milieu le microbe de Pfeiffer cultivait mais cultivait mal. Au bout de 5 jours les cultures furent filtrées sur filtre Chamberland et on choisit 2 cobayes auxquels on fit l'inoculation dans le cerveau de 1/10 c.c. et de 3/10 c.c. de culture; ce dernier cobaye tomba sur le flanc à la suite de l'injection, nous le crûmes perdu, mais le lendemain les 2 cobayes furent retrouvés vivants et bien portants. Ni l'un ni l'autre n'ont succombé. On prélève 10 c.c. du filtrat mentionné et on l'injecte dans le péritoine d'un cobaye de 250 gr. Il n'a pas été malade et a survécu à cet essai. Nous n'avons pas refait ces expériences depuis que notre microbe est devenu virulent.

D'après ce que nous venons d'exposer le microbe race M. M. tuait les animaux en expérience, lorsqu'on l'injectait dans le cerveau, mais il ne donnait aucun résultat lorsqu'on l'injectait dans le péritoine ou dans le sang. Nous avons cherché à exalter la virulence de ce microbe.

Fortement pénétré de l'idée que l'immunité naturelle est fonction cellulaire, nous nous sommes dits que le meilleur moyen d'exalter la virulence d'un microbe est de diminuer la résistance de l'organisme. Nous avons pensé un moment pour paralyser les leucocytes, à recourir à l'emploi de la teinture d'opium suivant la méthode employée par notre ami le Dr Cantacuzène dans des recherches sur le vibrion cholérique, mais nous avons préféré le procédé que nous a indiqué le Dr Besredka qui faisait des recherches sur le sérum leucotoxique.

Malheureusement à ce moment il était à court de sérum et il n'a pu nous en donner qu'un vieux reste. Or ce vieux reste injecté à un cobaye a été impuissant dans son action pour diminuer la résistance de l'organisme.

La lecture du mémoire de Roux et Vaillard attira notre attention sur l'action chimio-taxique négative de l'acide lactique. Nous l'essayâmes d'abord à l'état de pureté, ou additionné de son volume d'eau distillée stérile. Mais il produisit des escharres profondes et nous changeâmes de méthode.

Voici la méthode suivie. Nos expériences ont porté exclusivement sur le cobaye :

Un cobaye de 600 gr. fut inoculé à 10 heures du matin avec 4 gouttes d'acide lactique ordinaire du commerce, diluées dans 1 c. c. d'eau distillée stérile. Immédiatement après l'injection on constata la présence d'un exsudat abondant, sanguinolent, dont les globules rouges constituaient la majeure partie.

L'animal a l'air de beaucoup souffrir.

A 11 heures on injecte 3 c. c. de bouillon dans lequel on a émulsionné 2 cultures de microbes de Pfeiffer sur gélose sanglante.

Marche de la température avant injection à 10 heures.	38°5
— après ac. lactique 11 heures.	36°2
— après microbes 12 heures.	34°8
— — 2 heures.	35°
— — 3 heures.	37°
— — 4 heures.	34°7
— — 5 heures.	33°7
— — 6 heures.	33°5

Le lendemain matin on le retrouva mort. A l'ouverture du péritoine on constata une abondance considérable de

liquide péritonéal. Ce liquide était franchement sanguinolent. Le foie était friable et recouvert d'un léger enduit fibrineux. La rate est augmentée de volume. Congestion intense de l'intestin qui présentait un peu l'aspect hortensia des intestins de cholériques. Les poumons présentaient des foyers hémorrhagiques. Le sang du cœur était coagulé, on avait de la peine à avoir du sang.

Examen microscopique. — L'exsudat péritonéal contient une énorme quantité de microbes libres. On voit aussi quelques rares leucocytes bourrés de microbes. Il y a de nombreux globules sanguins.

Sur l'épiploon on voit des leucocytes plus nombreux que dans le liquide péritonéal, contenant des microbes. Beaucoup de microbes libres et des globules sanguins. L'examen du sang ne montre pas de microbes.

L'ensemencement de l'exsudat péritonéal nous donne une culture abondante de b. de Pfeiffer mais contaminée par le coli-bacille.

L'ensemencement du sang du cœur nous donna quelques colonies de b. de Pfeiffer pur au bout de 48 heures. Cette culture fut réensemencée (deux tubes d'agar dans 4 c. c. bouillon) et au bout de 24 heures on l'injecta dans le péritoine d'un deuxième cobaye de 650 gr. qui avait reçu une heure avant 1 c. c. d'eau distillée stérile avec 3 gouttes d'acide lactique.

29 oct. temp. à	10 h., avant l'ac. lactique	. . .	38°1
—	11 h., 1 h. après l'ac. lactique	. . .	37°
—	12 h., 1 h. après l'inj. de microbes.		38°5
—	2 h.	—	39°
—	3 h.	—	40°2
—	4 h.	—	38°5
—	6 h.	—	38°5

30 oct. temp.	matin	—	39°
—	6 h. soir	—	39°7
31 oct. temp.	matin	—	39°7
—	midi	—	39°
1 ^{er} nov. temp.	matin	—	39°2
—	soir	—	39°2
2 nov. temp.	matin	—	37°1
—	soir	—	36°2
3 nov., matin, on le retrouve mort.			

Autopsie. — L'animal a beaucoup maigri, il a perdu 100 gr. de son poids, et ne pèse plus que 530 gr.

A l'ouverture du péritoine on constate un abondant exsudat purulent agglutinant les intestins. Le foie est recouvert d'un enduit fibrineux et il est très friable. La rate est augmentée de volume et adhère à la paroi péritonéale. Les intestins sont noyés dans du pus épais. Il y a de la pleurésie séreuse et de la péricardite. Les poumons n'ont pas l'air d'être altérés, le sang du cœur est fluide. L'examen du pus péritonéal montre un grand nombre de leucocytes polynucléaires et mononucléaires. A l'intérieur des polynucléaires il est possible d'apercevoir des vertiges microbiens. L'ensemencement reste stérile. L'ensemencement du sang de même.

Nous reprîmes donc l'expérience en la recommençant.

Un nouveau cobaye reçut 4 gouttes d'acide lactique.

Son sang ensemencé cultiva assez abondamment.

On refit deux cultures âgées de 24 heures et on les injecta à un *cobaye* de 460 gr. qui avait reçu préalablement une heure avant, 3 gouttes d'acide lactique dans 1 c. c. d'eau distillée stérile.

Température avant l'injection . . 38°5

L'injection de l'acide lactique est faite à 2 heures et demie après-midi.

A 3 heures et demie 37°7

on fait l'injection de microbes.

A 4 heures et demie 36°

A 5 heures et demie 35°6

A 6 heures et demie 33°

Le lendemain à 9 heures du matin on le trouve mort.

Il avait le ventre verdâtre est ballonné.

Autopsie. — A l'ouverture du ventre on constata un liquide abondant peu sanguinolent. Forte congestion de la paroi abdominale, des intestins et de l'estomac qui est distendu et se déchire facilement. Le foie et la rate sont recouverts d'exsudat. La rate surtout est énorme, noirâtre. Le poumon a l'air normal. Le sang est en partie coagulé. Dans l'exsudat péritonéal l'examen microscopique révèle une quantité énorme de microbes formant de véritables plaquettes de corps microbiens, de globules rouges et quelques rares leucocytes.

Sur l'épiploon on retrouve des microbes libres, mais surtout d'abondants polynucléaires bondés de microbes, et aussi beaucoup de globules sanguins. L'examen du sang montre l'absence de microbes. L'ensemencement du sang donne une abondante culture.

Expérience avec 2 gr. d'acide lactique. — On fait cet essai avec deux cobayes. Chacun d'eux reçoit deux gouttes d'acide lactique dans 1 c. c. d'eau distillée stérile. Une demi-heure après chacun d'eux reçoit dans le péritoine deux cultures âgées de 24 heures provenant du passage précédent émulsionné dans 3 c. c. de bouillon.

Expérience A, cobaye, 480 gr. :

A 10 heures et demie, température. . . 38°2

Il reçoit à ce moment l'injection d'acide lactique.

A 11 heures, température 37°8

Reçoit à ce moment les microbes.

A 12 heures, température 36°5

A 2 heures 36°

A 4 heures 36°5

A 5 heures et demie 33°

A 9 heures 33°

Autopsie. — Paroi de la cavité péritonéale très hyperhémiee (rouge sombre) parsemée ainsi que sont les viscères de grumeaux purulents. Liquide péritonéal rougeâtre-louche. Estomac non digéré. Vésicule biliaire énorme distendue de bile claire. Foie congestionné, muscade, mou et déchirable. Rate énorme, molle et hyperhémiee.

Mésentère hyperhémie. Reins gorgés de sang. Poumon rouge cerise sur les bords, hépatisé au centre. Péricarde contenant un peu de liquide clair non purulent.

Frottis. — Exsudat péritonéal. Nombreux microbes libres, quelques-uns en amas. Globules rouges nombreux.

Polynucléaires bourrés de microbes très nombreux.

Épiploon. — Microbes libres, globules rouges, polynucléaires et mononucléaires nombreux remplis de microbes.

Frottis de rate. — Quelques microbes libres. Quelques mononucléaires et polynucléaires bourrés de microbes.

Examen du sang. — Pas de microbes au microscope. L'ensemencement sur deux tubes donne au bout de 48 h.

quelques rares colonies de microbes, se développant surtout du côté du fond du tube, où il y a une quantité assez abondante d'eau de condensation et du sang de pigeon.

Expérience B. — En même temps que le cobaye précédent on injecte un deuxième cobaye de 440 gr.

20 nov.	Température. Avant l'acide lactique . . .	38°9
	Une demi-heure après l'acide lactique. . .	38°4
	Une heure après l'injection des microbes :	
	Midi	37°2
	2 heures.	37°
	4 heures.	36°
	5 heures et demie.	35°
	9 heures.	34°5
21 nov.	Matin, vivant	35°6
	Soir	36°7
22 nov.	Soir	39°5
23 nov.		39°2
24 nov.		40°
25 nov.		39°5
26 nov.		39°2

On le pèse à ce moment et on voit qu'il a beaucoup diminué. Il ne pèse plus que 320 gr.

27 nov.		39°
28 nov.		37°2
29 nov.		36°2

5 déc., on le trouve mort.

Avant l'autopsie on le pèse et il n'a plus que 270 gr.

A l'autopsie on constate un véritable magma que forment les intestins agglutinés. La paroi péritonéale est complètement dépolie et rugueuse. Dans le magma intestinal on peut voir des masses fibrineuses plus consistantes et adhé-

rentes soit à l'épiploon soit aux intestins. Le foie et la rate sont recouverts d'une véritable gaine purulente.

La rate est augmentée de volume, couverte d'exsudat et nous montre toute sa surface parsemée de petits lymphômes (tubercules).

Le foie noirâtre montre sur sa face convexe un abcès de la grosseur d'une petite noisette.

Epanchement purulent dans la plèvre. Le poumon est ratatiné contre la colonne vertébrale. Le péricarde aussi est distendu par du pus.

L'examen microscopique nous montre que le péritoine, la plèvre, le péricarde contenaient une grande quantité de leucocytes polis et mononucléaires. Ces derniers étaient distendus par le nombre de débris de polynucléaires qu'ils contenaient. Pas de traces de microbes.

Les petits lymphômes de la rate n'étaient que des petits abcès dont nous aurons encore l'occasion de parler.

Le pus de péritoine et de la plèvreensemencé ne donne rien. Le sang resta stérile. Le pus de l'abcès du foie nous donne une espèce de gros coccus prenant le Gram.

Avec la culture provenant du premier cobaye nous commençons 4 tubes de gélose sanglante.

Expériences avec une goutte d'acide lactique. — Sur deux cobayes.

Expérience A. Cobaye, 500 gr. — On l'inocule à 10 heures avec 1 c. c. d'eau distillée stérile additionnée d'une goutte d'acide lactique. Température après acide lactique 37°5.

A 10 heures et demie injection de deux cultures sur agar sanglant émulsionnées dans 3 c. c. de bouillon.

Température, midi	36°5
— 2 heures	36°
— 4 heures	37°3
— 6 heures	38°3
— 9 heures	38°9

26 novembre	36°0
27 novembre	40°0
28 novembre	39°0
29 novembre	38°5

L'animal est bien portant, mange bien et continue de vivre. Augmente de poids.

<i>Exp. B. Cobaye</i> , 350 gr. Température. . . .	38°5
1/2 heure après acide lactique	37°2
1/1 heure 1/2 après les microbes	36°0
2 heures —	36°5
4 heures —	35°5
6 heures —	33°0
9 heures —	mort.

A l'autopsie on constate un exsudat abondant purulent mais non sanguinolent.

Paroi abdominale congestionnée, rouge,

Intestin grêle très distendu et congestionné.

Estomac présentant plusieurs ecchymoses sous-péritonéales (quoique l'autopsie ait été faite immédiatement après la mort).

Le foie est noir et diffus, présente un dépôt fibrineux à sa surface convexe. Sa partie concave est blanche grisâtre.

Rate grosse. — Le rein est fortement congestionné, pou-

mon rouge cerise à droite, à gauche coloration vineuse avec taches ecchymotiques.

Frottis. — L'exsudat péritonéal montre des microbes libres en amas nombreux. Peu de leucocytes et phagocytose peu intense.

Épiploon. — Nombreuses hématies.

Beaucoup de microbes libres. Peu de polynucléaires bourrés de microbes. Des cellules épithéliales et deux mastzellen.

Frottis de rate. — Nombreux microbes libres, des poly et des mono-nucléaires bourrés de microbes présentant des formes variables de digestion intra-cellulaire.

L'ensemencement du sang et de la rate montre au bout de 24 heures des colonies nombreuses, transparentes de microbes de Pfeiffer en culture pure. La culture provenant du cobaye de 350 gr., fut inoculé à un cobaye de 320 grammes, cobaye. On lui fit l'injection de deux cultures pour être plus sûr de la mort de l'animal, sans ac. lactique.

Nous donnons la marche de la température :

Avant l'injection 38°0

(l'injection fut faite à 11 heures).

A midi 36°3

A 2 heures 1/2 35°5

A 4 heures 1/2 35°2

A 5 heures 1/2 34°5

A 6 heures 1/2 33°5

On le retrouva mort le lendemain.

Les résultats de l'autopsie furent en tout point semblables aux précédents.

Nous nous dispensons de donner le compte-rendu de

l'autopsie qui nous exposerait à des redites. Toutefois le sang du cœur ensemencé ainsi que celui de la rate, resta stérile, tandis que dans le péritoine et sur l'épiploon on voyait un nombre considérable de microbes libres.

A quoi est dû cet insuccès ? Pourquoi n'avons-nous pu cultiver les microbes du sang ?

D'après les procès-verbaux des autopsies précédentes on a pu se rendre compte que les microbes tantôt cultivaient, tantôt ne cultivaient pas. Quelquefois quand ils cultivaient la culture ne devenait apparente qu'au bout de 48 ou 72 heures, lentement et ne se développait qu'au fond du tube du côté où se trouvait l'eau de condensation.

Meunier avait avant nous noté cette particularité. Nous désespérions de trouver la solution du problème lorsque nous assistâmes à une leçon de M. Metchnikoff qui signalait le fait publié par des bactériologistes allemands à propos de la fièvre typhoïde. Ces auteurs ont essayé d'ensemencer des gouttes de sang retiré au niveau des taches lenticulaires des typhiques. Le résultat fut négatif tant qu'ils ensemencèrent sur gelose. Mais lorsqu'ils ensemencèrent sur bouillon ou bien lorsqu'ils diluèrent la goutte de sang retirée avec un peu de bouillon, ils obtinrent des cultures caractéristiques de bacilles typhiques. Nous nous sommes demandés alors s'il ne se passait pas quelque chose d'analogue avec le microbe de Pfeiffer, et si le sang des cobayes que nous ensemencions, n'était pas bactéricide pour le peu de microbes qui s'y trouvaient.

Delius et Kolle qui ont expérimenté avec un microbe beaucoup plus virulent que le nôtre, même après des nombreux passages, se sont heurtés au même écueil. Cette façon de voir était rendue d'autant plus probable que nous avons remarqué que les cultures sont d'autant moins abondantes que l'ensemencement était fait à une heure

plus éloignée de l'heure de la mort. Lorsque l'ensemencement était fait immédiatement après la mort il y avait plus de chance que cet ensemencement fût fertile.

Nous fîmes souvent depuis lors l'expérience suivante : quand un animal mourait nous ensemencions deux tubes de gélose sanglante : l'un peu humide recevait une grande quantité de sang du cœur. L'autre très humide et qui contenait beaucoup de liquide, était ensemencé de la façon suivante : on retirait avec la pipette quelques gouttes du sang d'un animal mort puis on aspirait dans la même pipette un peu de bouillon-sang de pigeon préparé d'avance et éprouvé. On ensemencait le tout sur gélose sanglante.

Lorsque le tube de gélose sanglante contenait beaucoup de liquide dans le fond, il suffisait d'aspirer dans la pipette qui contenait le sang du cœur, le liquide du fond du tube et d'ensemencer ensuite avec, la surface du même tube. Nous avons pu nous assurer de cette façon que le *second tube*, ensemencé comme nous le conseillons, contenait des colonies de b. de Pfeiffer plus ou moins abondantes, tandis que le premier tube bien qu'ayant une quantité de sang bien supérieure au second, contenait soit très peu, soit le plus souvent aucune colonie.

Nous sommes allés plus loin. Nous avons infecté un cobaye avec le microbe de Pfeiffer et nous avons retiré son sang quelques heures avant sa mort (6 heures après l'infection). Nous laissâmes se former le caillot et nous ensemencâmes le sérum sur gélose sanglante. Le tube reste stérile. Nous prîmes ensuite 2 c. c. de ce sérum, nous l'ensemencâmes avec une anse de Platine en même temps que du b. de Pfeiffer âgé de 24 heures et nous le laissâmes à l'étuve pendant 24 heures. Le microbe n'avait pas pullulé (le sérum était absolument dépourvu de sang) mais n'était pas

mort non plus puisque une goutte de ce mélange, retirée du fond du tube nous donna du b. de Pfeiffer pur sur agar sanglant.

D'après cet exposé on voit que l'expérience ne répond pas absolument à notre hypothèse. Peut-être que la quantité de microbes était trop grande. Quoi qu'il en soit, et ce point demande des nouvelles recherches, nous conseillons formellement notre pratique d'ensemencement. Depuis que nous l'employons nous n'avons presque pas eu de déboires.

Par de nombreux passages nous sommes arrivés à avoir une race qui tue lorsqu'on injecte dans le péritoine à la dose d'une culture (1^{er} janvier 1901). Nous détachons de notre carnet d'expériences le cas d'un cobaye, qui peut servir de type à l'étude de l'infection.

Cobaye, 610 gr.

Nous l'inoculons le soir à 6 heures, et nous l'emportons pour étudier en détail la marche de l'infection.

Température avant l'injection	38°5
à 8 heures.	40°0
à 10 heures.	38°2
à 1 heure	34°5

Déjà à 8 heures l'animal est inquiet, reste immobile dans sa cage, son poil se hérisse et réagit peu. Il ne touche pas aux aliments placés devant lui. De 9 heures à 10 heures il s'affaisse sur son arrière-train. De temps en temps il est secoué par des frissons à la suite desquels il change de place. Sa respiration est anhelante. Vers 2 heures, la température est à 34°; les frissons deviennent très fréquents, ils apparaissent un peu irrégulièrement toutes les 2 et 3 minutes, quelquefois plus fréquemment encore.

La respiration est fréquente, l'inspiration se fait avec bruit, on peut compter 55 respirations à la minute. La respiration est régulière, entrecoupée seulement toutes les 8-10 inspirations d'une inspiration plus brève que les autres suivie d'expiration prolongée, phénomène qui coïncide avec les frissons qui deviennent de plus en plus fréquents ; vers deux heures et demie ils se répètent toutes les 30 secondes.

De temps en temps quelques grands frissons, l'animal s'étire et s'arc-boute sur son train postérieur affaissé, et sur ses pattes antérieures étendues, il finit par tomber de côté incomplètement, puis se relève ; à ce moment sa température est de 33°, il est 3 heures du matin. Le lendemain matin à 8 heures il était couché sur le flanc mais encore vivant, sa température était de 32°.

En le prenant en main et en palpant le ventre on constate que celui-ci est tendu, très douloureux, car en effet lorsqu'on le touche l'animal renverse la tête avec une intense expression de douleur.

A 10 heures.	31° 5
A 12 heures 1/2	29°
A 1 heure	mort.

A 2 heures on constate à l'autopsie :

Congestion intense de la partie abdominale, exsudat purulent abondant. Congestion de l'estomac et des intestins. L'estomac présente, à sa face antérieure, plusieurs taches noirâtres, il est véritablement truffé. On ouvre l'estomac et on constate que les points noirâtres correspondent à de véritables hémorragies, dont le sang en voie de digestion donne cette couleur noirâtre. Au niveau de l'une d'elles, on constate que la paroi stomacale est en imminence de rupture ; on voit un véritable ulcère de l'estomac creusé de

la muqueuse vers la séreuse qui paraît seule résister. Cette nécrose de la paroi stomacale n'est pas un phénomène *post mortem* comme il arrive quelquefois lorsqu'on tarde à faire l'autopsie. Par une série d'expériences, en sacrifiant l'animal lorsque sa température baissait de 33 ou 32° nous avons pu nous assurer que ce phénomène apparaissait fréquemment dans la septicémie avec le microbe de Pfeiffer.

En continuant l'autopsie on constate que la rate est augmentée de volume, le foie est friable et noirâtre, sa surface recouverte ainsi que celle de la rate d'un épais enduit fibrineux. Les reins sont congestionnés. Le poumon présente des taches ecchymotiques vers ses bases, tandis que les sommets sont rouges. Le sang du cœur est liquide.

1. *Examen des organes.* — L'exsudat péritonéal sur lamelle nous montre un certain nombre de microbes libres, pas très nombreux ; de nombreux leucocytes poly et mononucléaires contenant de nombreux microbes, la plupart en voie de digestion et quelques globules rouges.

Sur des frottis faits avec l'épiploon on constate : des microbes libres. La plupart de ces microbes libres se présentent comme nous l'avons dit déjà sous la forme de cocco-bacilles, un peu allongés, avec protoplasma rejeté aux deux extrémités, réunies par deux lignes très fines qui représentent l'enveloppe du microbe. Si on les regarde avec un grossissement un peu faible, l'aspect est nettement celle d'un pseudo diplo-cocque mais dont les éléments sont excessivement fins. Justement pour éviter des erreurs nous avons pris l'habitude d'examiner et les microbes et les frottis d'organes avec un grossissement considérable ; le 18 de Leitz comme immersion, le numéro 6 de Zeiss comme oculaire compensateur. En dehors des microbes tous colorés en bleu, on constate sur la prépara-

tion un grand nombre de leucocytes. Ces leucocytes sont soit des mono, soit des polynucléaires tous bourrés de microbes. Les leucocytes ont avalé des quantités énormes de bacilles. Ces bacilles intra-leucocytaires présentent deux caractères importants, la forme et la coloration .

La forme est très variable. Depuis la forme en navette à bouts très légèrement arrondis, jusqu'aux formes rondes, gonflées, en tout points analogues aux formes en « phénomènes de Pfeiffer » que prend le vibrion cholérique, on peut observer toute la gamme intermédiaire. Certaines d'entre elles sont arrondies, nous les avons rencontrées dans les vieilles cultures... Mais d'autres sont bien plus grandes, à peu près une dizaine de fois sinon plus, que les dimensions habituelles du microbe, et comme elles prennent diversement la couleur certains points se colorant d'une façon plus intense, d'autres moins, l'aspect général devient celle d'une élégante rosace.

Nous n'avons pu élucider si ces grandes formes proviennent d'un seul microbe ou de plusieurs microbes englobés dans la même vacuole digestive.

Suivant que la digestion cellulaire est plus ou moins avancée, les microbes en voie de digestion cessent d'être basophiles et deviennent acidophiles. On voit donc à l'intérieur des leucocytes et même en dehors (microbes provenant de leucocytes écrasés) toute une gamme de couleurs allant du rouge intense au bleu intense en passant par le violet. (La coloration a été faite à l'éosine et au bleu Borrel).

Il se passe donc pour le microbe de Pfeiffer ce que M. Metchnikoff a signalé pour le vibrion cholérique et que d'autres observateurs ont signalé depuis pour d'autres microbes.

Le frottis de rate nous montre en dehors de quelques

microbes libres peu nombreux, quelques mono-nucléaires bourrés de microbes, en voie de digestion.

L'examen du sang reste négatif. Mais l'ensemencement du sang, de la rate, de la moelle des os et du cerveau, donne des résultats positifs. L'ensemencement fait avec du sang est très abondant. La moelle des os beaucoup moins. Sur l'ensemencement fait avec le cerveau on n'observe que trois colonies.

Nous avons recherché les microbes sur des coupes d'organes : ni le rein, ni le foie, ni les ganglions mésentériques examinés en détail n'ont donné des résultats. Ce n'est que dans la rate que nous avons pu déceler leur présence. Mais dans cet organe, contrairement à ce qu'on a observé sur des frottis on n'a jamais vu de microbes libres. Les microbes qu'on a constatés étaient tous à l'intérieur des leucocytes et quelques-uns en voie de digestion. Les phagocytes poly et mono-nucléaires contenant des microbes étaient irrégulièrement disséminés dans les sinus de la rate fortement distendus.

L'observation qui précède peut servir de type à l'infection par le bacille de Pfeiffer.

L'animal succombe en somme à une péritonite aiguë avec généralisation du microbe dans le sang.

Si nous ne décrivons pas d'autres expériences c'est qu'en tout points analogues aux précédentes, elles n'apprendraient rien de nouveau au lecteur.

Par contre nous en relaterons un certain nombre dont la description ne cadre pas avec la précédente.

En faisant des passages pour entretenir la virulence du microbe en vue des vaccinations en cours d'expériences, nous avons constaté sans que nous puissions les expliquer, des variations dans la virulence du microbe, ou plutôt dans la résistance de l'organisme.

Ainsi pendant une semaine ou deux, notre culture tuait régulièrement l'animal en expérience, puis tout à coup sans que rien le fasse prévoir, tout en injectant les mêmes doses qui étaient mortelles dans la quinzaine précédente on tombe sur un animal qui résistait. Cet animal ne présentait rien de particulier, quelquefois même il avait un poids moindre que les précédents.

Ainsi le 18 décembre, on inocule dans le péritoine d'un cobaye de 490 grammes une culture sur gélose sanglante (dose mortelle). L'inoculation est faite à 4 heures du soir.

Température avant l'inoculation.	38° 5
à 6 heures.	41° 1
à 7 heures.	41° 3

Le 19 décembre	le cobaye est vivant.	Matin	39° 5
20	—	—	39° 2
21	—	—	39°
22	—	—	39°

Il a l'air bien portant. Il s'alimente bien ; toutefois il maigrit d'une façon visible. Il meurt le 5 janvier. Il a beaucoup diminué de poids et ne pèse plus que 320 grammes.

A l'autopsie : La surface du péritoine est complètement dépolie et même rugueuse. Il y a de fortes adhérences avec l'intestin au niveau du point où l'injection a été faite ; l'estomac est petit ; les parois en sont épaissies. La rate est fortement collée par son bord supérieur à la paroi abdominale.

Il y a de même de fortes adhérences entre le bord inférieur du foie, les intestins et la paroi abdominale ; elles déterminent de cette façon la formation d'une poche entre le bord convexe du foie et le diaphragme. Cette poche est remplie d'un pus caséeux. Dans l'épaisseur de l'épiploon on

rencontre la présence d'un nodule plus gros qu'une lentille et qui, à la coupe, laisse échapper du pus caséeux.

Le foie est noirâtre, la rate est grosse, et sa surface parsemée de granulations grosses comme des têtes d'épingles.

Le bord antérieur des deux poumons est fortement sclérosé, dur à la coupe. L'aspect général ressemble tellement à la tuberculose, que nous n'hésitâmes pas à inoculer un cobaye témoin.

A l'examen du pus sur lamelle, après coloration par le Ziehl, il n'y avait que des débris leucocytaires informes sans microbes. Le cobaye témoin ne présenta aucun signe de tuberculose ; l'ensemencement du pus sur gélose-sang ne donna que des staphylocoques ; l'ensemencement du sang resta stérile.

Les coupes de la rate nous montrèrent que les petites granulations répondaient à de véritables abcès disséminés dans la pulpe splénique ; ces abcès exclusivement formés de poly et de mono-nucléaires, disposés circulairement autour de 2-3 polynucléaires contenaient des microbes encore visibles.

Nous avons relevé une vingtaine de cas analogues aux précédents. Enfin d'autres fois l'organisme réagissait d'une façon plus curieuse.

Petit cobaye. — Poids 350 gr. reçoit une culture dans le péritoine le 15 janvier à 10 heures du matin.

Température avant l'injection.	39°1
à 3 heures.	35°5
à 6 heures du soir	35°5

Le lendemain matin on le retrouve vivant, température 39°5. Les jours suivants il continue à être bien portant, il mange bien et ne maigrit pas ; il augmente même de poids.

Le 1^{er} février il pèse 400 gr. : nous nous décidons à le sacrifier.

Autopsie. — Il se présente sous l'aspect d'un cobaye absolument sain ; la rate est normale, ainsi que les autres organes ; les frottis de même que les ensemencements restent complètement négatifs.

Voici donc les trois formes essentiellement diverses sous lesquelles se présente l'infection expérimentale. Toutefois nous ferons remarquer qu'au fur et à mesure des passages, le microbe devient de plus en plus virulent, et les deux dernières réactions deviennent de plus en plus rares. Ainsi, dans ces 6 derniers mois, nous ne rencontrâmes pas une seule fois, ni la forme de réaction avec formation d'abcès, ni la forme de résistance parfaite, par la simple raison que la virulence du microbe étant considérablement exaltée, les animaux étaient tués à coup sûr.

Avant de terminer cette étude nous voulons attirer l'attention sur les variations de la température. D'après les précédentes expériences, on a pu voir que dans la majorité des cas, lorsque l'animal doit mourir, l'hypothermie est manifeste ; par contre, lorsqu'il échappe à l'infection, sa résistance se traduit par de la fièvre.

Ce fait présente une certaine importance, parce qu'il fournit un appui expérimental à la théorie d'après laquelle la fièvre est salubre à l'organisme ; de plus, chez des animaux qui présentaient d'abord une baisse de température, suivie d'une brusque élévation, nous nous sommes assurés par des prises péritonéales successives, que tant qu'il y a des microbes libres dans le péritoine, la température reste basse mais que dès que la phagocytose est complète il y a élévation. En effet, on voit alors de nombreux microbes à l'intérieur des leucocytes, mais pas de microbes libres ; de sorte que dans l'étude de l'infection par le microbe de Pfeiffer la phagocytose et la fièvre marchent parallèlement.

Nous citerons à ce propos l'expérience que nous fîmes le 20 septembre dernier dans un autre but, celui de déterminer la dose minima mortelle de notre microbe. Une culture âgée de 24 heures, sur gélose sanglante émulsionnée dans 6 c.c. de bouillon fût injectée dans le péritoine de 3 cobayes à 9 heures du matin ; en même temps qu'on prenait la température, on faisait des prises péritonéales.

Voici le détail de cette expérience :

Température avant l'injection	Cobaye A (450 gr.)	Cobaye B (350 gr.)	Cobaye C (380 gr.)
9 h.	38°5 Inoculation	39°1 Inoculation	38°2 Inoculation
11 h.	36°2	37°0	36°0
	L'exsudat péritonéal nous donne chez les trois animaux le même résultat, à savoir : nombreux microbes libres et quelques polynucléaires contenant des microbes		
2 h.	36°0 Phagocytose énergique, beaucoup de microbes libres	35°5	37°0 Phagocytose énergique ; les leucocytes paraissent plus nombreux, il y a des microbes libres, mais moins que dans les cas précédents.
5 h.	34°2 Phagocytose énergique ; nombre énorme de microbes libres	33°1	40°2 Le pus est épais, filant ; à l'examen : polynucléaires bourrés de microbes ; ces microbes sont en voie de digestion, nous faisons un ensemencement sur gélose sanglante.
			12 h. après à l'examen de l'ensemencement on voit de grandes formes filamenteuses sortir des leucocytes dont on devine les vestiges (ce sont évidemment des formes de souffrance). La même culture examinée 24 h. après l'ensemencement montre que les formes filamenteuses ont disparu presque complètement ; on n'en voit plus que très peu parmi des formes types.

Température avant l'injection	Cobaye A (450 gr.)	Cobaye B (350 gr.)	Cobaye C (380 gr.)
7 h.	31° Microbes libres très nombreux, phagocytose considérable.	<i>Mort</i> <i>Autopsie.</i> — Lésions habituelles; le sang ensemencé donne des cultures pures de bacilles de Pfeiffer.	39°8 Polynucléaires bourrés de microbes; formes de digestion diverses; quelques mononucléaires.
<i>Le lendemain matin</i>	<i>Mort</i> <i>Autopsie.</i> — Lésions habituelles; le sang ensemencé, donne des cultures pures de bacilles de Pfeiffer. L'exsudat péritonéal est remarquable par le nombre de microbes libres qu'il contient.		39°2 On fait une prise péritonéale: le pus est très épais; on y voit de nombreux mononucléaires à protoplasma bourré de noyaux de polynucléaires nettement visibles et colorables. Le noyau des mononucléaires est rejeté à la périphérie et aplati; on ne trouve plus de microbes.

Essais avec des microbes tués

Nous tuons nos microbes en les faisant séjourner pendant une demi-heure, dans une étuve à 55°. Les essais que nous avons faits avec des microbes tués à des températures supérieures (80°, 100° et 120°) ne nous ont pas indiqué une augmentation quelconque de la toxicité.

Voici le compte-rendu détaillé de l'expérience. Une douzaine de cultures Delius et Kolle, âgées de 3 jours, émulsionnées dans 24 c. c. de bouillon sont mises pendant une heure dans une étuve à 55°.

Les trois cobayes n^{os} I, II et III) reçoivent chacun 8 c. c. de cette émulsion.

DATES	Cobaye I (480 gr.)	Cobaye II (600 gr.)	Cobaye III (600 gr.)
1 ^{er} mars (température avant l'injection). L'injection est faite à 9 heures.	38°0	38°7	38°2
2 mars	37°2	39°3	38°0
3 —	35°2	37°2	37°8
4 —	39°8	39°4	39°6
5 —	39°6	39°9	39°7
6 —	39°6	40°1	39°5
7 —	39°7	40°3	40°2
8 —	39°4	39°6	40°5
9 —	39°0	39°2	39°5
10 —	39°0	39°0	38°8
11 —	39°0	39°0	38°2
12 —	38°5	39°0	38°5
Le 25 mars leur poids était . . .	490 gr.	620 gr.	580 gr.
Le 5 juin leur poids était . . .	430 gr.	675 gr.	640 gr.

Nous ne sommes pas parvenus à faire mourir les animaux avec des microbes tués; toutefois en injectant des doses répétées de microbes tués, les animaux meurent de cachexie.

Voici le tableau d'une vaccination avec microbes tués par séjour dans une étuve à 55° pendant une demi-heure.

Dates	Cobaye A (830 gr.)	Cobaye B (740 gr.)	Cobaye C (660 gr.)
12 mars	Chacun des trois animaux reçoit une culture tuée à 55°		
25 mars	770 gr.	745 gr.	660 gr.
20 avril	810 gr.	725 gr.	Meurt d'une infection étrangère au bacille de Pfeiffer. Par mégarde son intestin a été piqué.
7 mai	840 gr.	620 gr.	
18 mai	800 gr.	Mort le 15 mai. Il ne présente rien de particulier à l'autopsie; son sang est stérile.	
5 juin	Reçoit six cultures tuées 800 gr. Reçoit sept cultures tuées		
	Commence à se cachectiser.		
1 ^{er} juillet	420 gr.		
3 juillet	Mort (Voir l'autopsie)		

Autopsie du cobaye A, mort le 3 juillet. — Péritoine dépoli ; adhérence des intestins à la paroi péritonéale ; entre cette paroi et le bord du gros intestin il s'est formé une énorme poche purulente, bien délimitée de toutes parts, qui contient du pus caséux.

La rate est pâle, jaunâtre et entourée de tous les côtés d'une épaisse coque fibreuse, qui la fixe à la paroi abdominale et à l'estomac ; il faut sculpter dans cette coque pour dégager la rate.

L'intestin est rétracté contre la colonne vertébrale. Le foie noirâtre présente le long de ses bords, plusieurs petits abcès de la grosseur d'un grain de mil ; son bord inférieur forme avec la paroi abdominale et l'intestin un magma très adhérent.

L'un des poumons est transformé en bouillie jaunâtre, l'autre est rouge et congestionné. L'examen du pus, nous montre des débris leucocytaires ; par-ci, par-là quelques leucocytes gardent des vestiges de leur forme et leur intérieur contient quelques microbes très pâles. L'ensemencement du pus péritonéal et du sang reste stérile.

Réaction de l'organisme contre l'infection

Pour élucider cette question, nous avons procédé de la façon suivante : nous avons fait deux séries d'expériences, portant chacune sur cinq animaux.

Dans une première série (A) nous avons injecté des cultures de bacilles de Pfeiffer à doses faibles (non mortelles).

Dans une seconde série, nous avons employé des doses fortes (sûrement mortelles c'est la série B).

SÉRIE A. — *Doses faibles* (non mortelles)

Le 5 mai nous injectons à 5 cobayes, 2 cultures Delius et Kolle âgées de 24 heures, émulsionnées dans 10 c. c. de bouillon. La dose mortelle à cette époque était une culture entière par animal. L'injection est faite à 10 heures.

1) *Cobaye*, 400 grammes. Température 38°5.

On fait une prise dans le péritoine, par le moyen de tubes capillaires qu'on y introduit après une légère incision superficielle faite avec des ciseaux, la peau du cobaye étant remarquablement dure. Nous faisons l'examen de cette prise en goutte pendante et sur lame.

15 minutes après l'injection l'examen en goutte pendante montre de nombreux microbes libres et quelques cellules (lymphocytes?).

L'examen sur lame fait voir des microbes libres abondants n'ayant subi aucune déformation, quelques lymphocytes et quelques cellules endothéliales.

30 minutes après l'injection on constate : la présence de microbes libres, de lymphocytes, de cellules endothéliales et de quelques polynucléaires ayant déjà englobé des microbes. Les microbes intra-cellulaires se colorent bien, ils sont toujours basiques.

Au bout de 60 minutes, température 39°, on sacrifie l'animal. On constate à l'ouverture du péritoine une congestion intense de tous les organes. Une quantité assez considérable d'exsudat séreux légèrement louche. Les organes ne présentent rien de particulier. Onensemence le sang, la moelle, la rate et l'exsudat péritonéal ; on fait des frottis avec tous les organes. Le sang ensemencé donne au bout de 24 heures une culture très abondante de b. de Pfeiffer pur. L'exsudat péritonéal, comme on devait s'y attendre, donne du b. de Pfeiffer en abondance. La rate et la

moelle cultivent aussi mais ne donnent que quelques rares colonies. L'examen sur lame des frottis de rate et de moelle et les préparations de sang ne montrent pas de microbes. L'examen de l'exsudat péritonéal montre des microbes libres, non agglutinés, mais dont l'agglutination se fait sous nos yeux 5 minutes après l'extraction de l'exsudat. Sur lamelle colorée on voit une quantité considérable de microbes libres et de nombreux polynucléaires remplis de microbes ; c'est surtout sur l'épiploon qu'on peut voir ces polynucléaires. Les microbes à l'intérieur des leucocytes commencent déjà à prendre la forme en navette, et quelques-uns prennent déjà des formes rondes.

Le point le plus remarquable, de cette expérience, c'est le passage rapide des microbes dans le sang ; une heure après l'injection.

2° *Cobaye*, 450 grammes, température 38°3.

On le sacrifie 2 heures après l'injection ; température à ce moment 38°. A l'ouverture du péritoine on constate : exsudat séreux dans le péritoine contenant des grumeaux en suspension visibles par transparence. Congestion intense de la paroi abdominale et des viscères.

L'exsudat péritonéal au microscope nous montre des paquets de leucocytes. Il y a peu de microbes libres. Ceux qu'on aperçoit sur des préparations colorées semblent sortir des leucocytes. Ceux-ci sont surtout des polynucléaires, ils contiennent de nombreux microbes et présentent les formes diverses de la digestion ; quelques-uns des microbes se colorent par l'éosine. Les frottis d'épiploon, nous montrent une quantité plus considérable de microbes libres, les uns isolés, les autres formant de petits amas ; les polynucléaires sont gonflés de microbes, quelques-uns fortement éosinophiles ; on voit en outre quelques hématies et des cellules endothéliales de l'épiploon.

La rate, la moelle osseuse donnent des frottis négatifs, de même que le sang ; mais ces mêmes organes ainsi que le cerveauensemencés donnent des cultures mais peu abondantes, *si ce n'est pour le sang qui en donne d'assez considérables.*

3° *Cobaye*. Poids 390 gr.

Température initiale : : : : : 38°7

— 7 heures après l'injection. 39°8

On le sacrifie à ce moment *Autopsie*: Congestion intense des organes, surtout de l'estomac dont tous les vaisseaux sont apparents. Foie et rate recouverts d'un léger enduit pultacé ; intestins très rouges, liquide péritonéal épaissi, il contient beaucoup de polynucléaires mais on n'aperçoit pas de microbes dans leur intérieur. Quelques macrophages dévorent des polynucléaires ; leur noyau est apparent, fortement coloré et entouré d'une vacuole de digestion, toutefois ils sont rares. Malgré l'absence de microbes constatée au microscope, dans le liquide péritonéal, l'ensemencement est positif. Les frottis d'épiploon mettent en évidence des leucocytes digérant des microbes ; ceux-ci ont pour la plupart des formes gonflées. Le même organeensemencé produit d'abondantes colonies. La rate produit quelques colonies, mais il nous est difficile de dire si ce n'est pas notre pipette qui, contaminée à la surface de cet organe a produit ce résultat.

Le sang, le cerveau, la moelle osseuse donnent des résultats négatifs.

4° *Cobaye*. Poids 370 gr.

Température initiale 38°1

— 24 heures après . 39°1

On le sacrifie à ce moment.

Autopsie : Les organes de la cavité abdominale sont légèrement congestionnés ; peu de liquide dans le péritoine ; à la surface du foie et de la rate, léger enduit pultacé, transparent. Sur l'épiploon et entre les masses intestinales on aperçoit de petits grumeaux fibrineux légèrement adhérents : ils sont formés par des masses de polynucléaires agglutinés par de la fibrine. L'exsudat péritonéal, épais, filant montre de jolies figures de mononucléaires dont quelques-uns contiennent 6 ou 7 polynucléaires, les noyaux de ces derniers en voie de digestion présentent des colorations différentes ; ceux des mononucléaires sont rejetés à la périphérie et aplatis par les vacuoles de digestion ; on n'aperçoit plus de microbes, l'ensemencement reste stérile.

Mêmes résultats avec les frottis d'épiploon, pas de microbes, mais en revanche l'ensemencement nous donne deux colonies dans un des tubes de culture.

La rate, le cerveau, la moelle osseuse et le sang restent stériles de toutes façons.

5° *Cobaye*. Poids 450 grammes.

Température initiale	38°5
— 24 heures après l'inoculation,	39°
— 48	38°5
— 72	38°2

On le sacrifie à ce moment.

Autopsie. — A l'ouverture du péritoine on voit que l'aspect des organes contenus dans la cavité abdominale est absolument normal. Pas de traces d'une inflammation antérieure, pas le moindre grumeau fibrineux ; la surface du foie et celle de la rate paraissent normales.

L'ensemencement de l'exsudat péritonéal (très peu abondant et transparent) de la rate, de la moelle osseuse du cerveau et du sang ne donnèrent aucun résultat.

Deux faits semblent ressortir de cette série d'expériences avec des doses faibles

1° L'animal supporte admirablement l'injection de petites doses, même lorsque le microbe est virulent.

2° Le passage du microbe dans le sang de l'animal se fait avec une grande rapidité, et c'est là le fait vraiment curieux.

Doses fortes (mortelles)

Nous inoculons 4 cobayes de poids assez fort avec 4 cultures âgées de 24 heures émulsionnées dans 12 c.c. de bouillon (Dose mortelle : une culture).

1° *Cobaye*. 598 gr. Température initiale 38°.

L'injection est faite à 8 heures 50 du matin.

Prises péritonéales 15 minutes après l'injection. — Nombreux microbes libres, quelques globules sanguins et quelques lymphocytes.

Trente minutes après l'injection. — On constate des microbes libres non agglutinés des polynucléaires assez nombreux, quelques-uns contenant des microbes, et aussi quelques mononucléaires (il ne faut pas oublier que par nos inoculations, nous injectons aussi du sang de pigeon qui nous sert à émulsionner nos cultures).

Une heure après l'injection. — Nombreux microbes libres non agglutinés et non déformés ; phagocytose énergique ; les leucocytes contiennent de 5 à 10 microbes chacun, quelquefois plus, lesquels présentent quelquefois des formes rondes. Nombreux globules sanguins.

Deux heures et dix minutes après l'injection. — Température 36°9. On sacrifie l'animal.

Autopsie. — A l'ouverture du péritoine on constate qu'il y a un exsudat assez abondant et contenant une quantité

assez forte de globules rouges. Rien de particulier à noter à part la congestion des parois et des organes.

Examen de l'exsudat. — Nombreux globules rouges ; quantité de microbes libres, non déformés, non agglutinés ; polynucléaires remplis de bacilles aux divers stades de la digestion, microbes gonflés et formes rondes éosinophiles.

Dans l'*épiploon*, nous trouvons des polynucléaires plus nombreux, pleins de bacilles de Pfeiffer, des éosinophiles vrais plus nombreux que d'habitude et beaucoup de pseudo-éosinophiles bourrés de microbes. Les microbes en voie de digestion sont arrondis et colorés par l'éosine.

Beaucoup de microbes libres.

L'ensemencement de la rate et de la moelle osseuse donne des cultures de bacilles de Pfeiffer ; le sang également.

2° *Cobaye*. Poids 605 gr.

Température avant l'injection.	38°5
— une heure après.	38°3
— deux —	37°5
— trois —	36°5

A ce moment on fait une prise d'exsudat péritonéal et on y constate, en goutte pendante, beaucoup de microbes libres non agglutinés, si on fait l'examen immédiat ; mais si on tarde cinq minutes seulement, on voit les microbes agglutinés. La leucocytose est abondante, les leucocytes se présentent en paquets de 7, 8 ou 15 éléments.

Préparation colorée. — Les polynucléaires sont le siège d'une phagocytose intense, 20 à 25 microbes dans chaque leucocyte. Quelques-uns se colorent déjà mal. Nombreux microbes libres.

5 heures et demie après l'injection ; température 35°5.

Prise péritonéale. — Examen immédiat. Beaucoup de microbes libres isolés. Deux minutes après, agglutination. Paquets de polynucléaires formant des amas.

Préparation colorée. — Augmentation évidente du nombre des microbes libres. Polynucléaires en paquets, bourrés de microbes ; beaucoup de formes de digestion à l'intérieur des leucocytes.

7 heures et 10 minutes après l'injection. Température 34°5.

Autopsie. — On sacrifie l'animal. Ouverture du péritoine.

Paroi abdominale fortement vascularisée, exsudat péritonéal abondant, purulent ; les intestins sont congestionnés ainsi que l'estomac ; on voit par transparence à l'intérieur de cet organe quelques foyers noirâtres ; lorsqu'on l'ouvre, on trouve une certaine quantité de sang provenant de ces foyers. Sur l'épiploon on voit des amas purulents. Le foie et particulièrement sa face inférieure en est complètement recouvert. La rate est pâle et couverte d'exsudat. Les capsules surrénales sont congestionnées, l'artère surrénale est nettement apparente ; les poumons ont une teinte rouge-cerise intense, le sang du cœur est liquide.

Examen de l'exsudat péritonéal en goutte pendante. — Pas d'agglutination ; elle ne se fait qu'au bout d'une minute ; nombreux microbes libres ; leucocytes bourrés de bacilles en amas.

Coloration (éosine, bleu de méthylène). Beaucoup de microbes libres, intacts ; éosinophiles vrais assez nombreux ; pseudo-éosinophiles très abondants ; les polynucléaires sont remplis de microbes, dont un certain nombre prend le bleu, mais dont la majorité se colore en rose ; on observe toute une gamme de couleurs : bleu, bleu pâle, rose pâle, rose intense, de granulations microbiennes ;

dans un leucocyte on observe un bacille en navette dont une extrémité se colore en bleu, l'autre en rose ; c'est cette dernière couleur que prennent la plupart des formes rondes.

Epiploon. — Microbes libres en petite quantité ; la plupart présentent la forme allongée en pseudo-diplobacille (nous avons déjà dit que c'est généralement sous cette forme que se rencontrent les microbes dans l'organisme) ; les phagocytes sont nombreux et bourrés de microbes ; on voit des macrophages, dans l'intérieur desquels se trouvent des globules de sang de pigeon et quelques rares microbes.

Les frottis de rate ne nous décèlent pas de microbes.

Ensemencement du sang. — Culture pure de bacilles de Pfeiffer (nous faisons remarquer en passant que ce même sang, ensemencé deux heures après l'injection, nous donne des colonies bien plus nombreuses).

Ensemencement de la rate et de la moelle osseuse. — Quelques rares colonies en culture pure.

3^o *Cobaye*. 680 gr.

Température avant l'injection	38°4
— une heure après. . . .	37°4
— deux —	37°5
— quatre —	37°1
— cinq —	36°8
— sept —	35°8
— neuf —	35°0

Neuf heures après, on prélève un exsudat péritonéal épais, filant, purulent.

Goutte pendante. — Début d'agglutination qui se fait

sous nos yeux (pendant la courte perte de temps qu'il a fallu pour paraffiner la lamelle).

Au bout d'une minute l'agglutination est complète, il n'y a plus de microbes libres.

Paquets de leucocytes.

Coloration par éosine-bleu. — Nombre considérable de microbes libres en bon état.

Polynucléaires en amas et remplis de leucocytes.

La plus grande partie des microbes englobés prennent l'éosine. Les microbes libres sont tellement nombreux qu'ils ont dû manifestement pulluler.

24 heures après. Température du cobaye 39°2.

L'animal est à l'agonie. On le sacrifie. A l'ouverture du péritoine on constate un exsudat franchement purulent. Dépôt fibrineux sur les organes. Intestins, estomac et mésentère fortement congestionnés. Ecchymoses stomacales disséminées par foyers.

Paroi péritonéale dépolie. Foie véritablement engainé dans l'exsudat, il est complètement blanc. On enlève facilement cette couche fibrino-purulente et on voit apparaître le tissu noirâtre du foie. Rate couverte d'exsudat. Congestion du rein et de la capsule.

Poumon congestionné.

Sang liquide.

En goutte pendante. — Le liquide péritonéal contient de nombreux microbes non agglutinés. Les microbes libres sont en quantité considérable. De rares leucocytes polynucléaires contiennent des microbes.

Bleu-éosine. — Microbes libres nombreux. Polynucléaires nombreux bourrés de microbes ; quelques-uns au début de la digestion.

Pas de microbes pseudo-éosinophiles à l'intérieur des leucocytes. La plupart des microbes prennent le bleu et se

colorent d'une façon assez intense. Quelques globules rouges.

Epiploon. — Leucocytose abondante. Microbes libres nombreux. Dans les phagocytes qui sont remplis de microbes on voit diverses formes de digestion. Toutefois ces formes de digestion ne prennent qu'en petit nombre l'éosine ; la plupart se colorent très fortement par le bleu.

Les *frottis de rates* montrent de nombreux microbes libres.

L'ensemencement du sang donne de nombreuses colonies de microbes de Pfeiffer. L'ensemencement de la rate et de la moelle osseuse donne mêmes résultats.

Le 4^e cobaye, de 605 gr., qui avait présenté la marche de température suivante :

Avant l'injection .	38°
1 heure . . .	37° ₂
2 heures. . .	36° ₅
4 heures. . .	35° ₅
7 heures. . .	33° ₉
9 heures. . .	33° ₆

fut trouvé mort le lendemain.

Son autopsie rentre dans les cas connus. Nous ne la donnerons donc pas. Le sang ensemencé contient du b. de Pfeiffer pur.

Nous avons refait les jours derniers l'expérience avec des doses mortelles de microbes pour voir la différence entre la réaction de l'organisme lorsque la dose est d'une culture entière par animal (ainsi que nous l'avons vu) ou lorsque cette dose mortelle est seulement d'un tiers de culture comme nous allons le voir :

3 cobayes sont inoculés dans le péritoine avec une culture âgée de 24 heures (160^e passage) émulsionnée dans 6 c.c. de bouillon.

Cobaye 1. 595 gr. Reçoit 2 c. c. de cette émulsion à 10 heures et demie du matin. Température 38° 9.

15 minutes après : On constate : des microbes libres non agglutinés, des erythrocytes de pigeon, quelques hematies de cobaye et quelques rares lymphocytes. En examinant toute la surface de la lame on peut même apercevoir quelques polynucléaires, rares d'ailleurs.

30 minutes après. Beaucoup de microbes libres et de lymphocytes. Les microbes libres ne gardent pas complètement leur forme. Leur protoplasme est rejeté plutôt vers les extrémités du microbe et prend une apparence vacuolaire. On n'aperçoit plus de polynucléaires.

60 minutes après. Microbes libres non agglutinés mais ayant repris leur forme primitive.

Pas de polynucléaires. — On sacrifie l'animal au bout d'une heure. Température 37° 1. L'exsudat péritonéal très abondant nous montre ce que nous avons déjà vu. Mais le frottis d'épiploon nous montre au contraire une phagocitose très énergique. On ensemence le sang du cœur, la rate, la moelle osseuse et le cerveau.

Au bout de 24 heures le sang a donné une culture très abondante. Le cerveau de même. La culture est moins abondante pour la rate et nulle pour la moelle osseuse.

Cobaye 2. 650 gr. Inoculé en même temps que le précédent. Température 38° 3.

2 heures après. 36° 7

3 heures après. 36° 5

Prise péritonéale faite 3 heures après l'inoculation. — Nombreux microbes libres ; ils pullulent manifestement. Rares polynucléaires contenant quelques microbes, la plupart vides.

5 heures après. 32° 5. Les microbes libres sont très nombreux ; les polynucléaires sont très rares.

7 heures après. 33°. On sacrifie l'animal. L'exsudat péritonéal montre un nombre considérable de microbes tandis que les phagocytes sont rares et contiennent très peu de microbes. Par contre sur l'épiploon on peut constater que les phagocytes sont nombreux et que la plupart sont remplis de microbes. L'ensemencement du sang, de la rate, du cerveau et de la moelle osseuse donne au bout de 24 heures les résultats suivants : le sang du cœur ensemencé présente quelques cultures de *b. de Pfeiffer* pur. Mais les colonies sont beaucoup moins nombreuses que les colonies recueillies dans le sang au bout d'une heure. Elles sont à peu près au rapport de 1 à 5. Le cerveau, la rate ont donné quelques colonies. La moelle osseuse est restée stérile.

Le 3^e Cobaye de 650 gr, est mort 9 heures après l'injection. Son autopsie et l'ensemencement des organes est calqué sur le précédent.

De l'exposé des faits on peut tirer les conclusions suivantes : que l'organisme soit inoculé avec des petites doses ou avec des grandes doses microbiennes la résistance de l'organisme se fait grâce aux leucocytes. Mais si dans le premier cas, la totalité des microbes est phagocytée et digérée, dans le second, bien que la phagocytose des microbes se fasse d'une façon assez active, un certain nombre plus virulents jouissent de chimiotaxie négative et ne sont pas phagocytés. Ces derniers pullulent alors et l'infection a lieu (1).

D'ailleurs on peut constater sur les deux séries que nous venons d'exposer que la virulence du microbe est due à l'acquisition de cette chimiotaxie négative qui est beaucoup

1. Il ne faut pas entendre par chimiotaxie négative la propriété qu'a le microbe doué de cette faculté de repousser les leucocytes à l'autre bout de l'organisme. Le microbe peut se trouver à côté du phagocyte, il n'est pas phagocyté. L'expérience classique de Bordet avec le streptocoque et le proteus peut servir de modèle pour les deux chimiotaxies.

plus manifeste dans la seconde série que dans la première.

A propos de cette étude nous ferons remarquer le rapide passage des microbes dans le sang. Dans notre expérience à doses élevées, mortelles, le nombre des microbes qui passent dans le sang au bout de la 1^{re} ou de la 2^e heure est de beaucoup plus considérable que ceux qui passent au bout de la 7^e heure par exemple, à en juger par le nombre des colonies développées à la suite de l'ensemencement.

Quel est le mécanisme du passage et de la disparition progressive des microbes? Nous ne sommes pas en état de fournir une réponse satisfaisante à cette question. Il est probable qu'ils passent entraînés par le courant dans le sang et que leur diminution progressive est due à la phagocytose qui se fait dans le sang même de l'animal.

Nous ne sommes pas parvenu à tuer le cobaye par injection sous-cutanée, même à des doses deux fois mortelles. Il se fait une phagocytose lente et progressive des microbes dans les tissus sous-cutanés. Nous avons retrouvé des microbes vivants à ce niveau jusqu'au 8^e jour après l'inoculation.

Quant aux recherches expérimentales que nous avons faites sur les souris et les lapins elles sont calquées sur les précédentes. Chez les uns et les autres on trouve des microbes dans le sang.

Quant aux lapins, les quelques données intéressantes qui ressortent de la réaction de l'organisme elles seront fournies au chapitre vaccination.

TROISIÈME PARTIE

Immunisation

Dans nos essais d'immunisation active nous nous sommes heurtés à un certain nombre de difficultés.

C'est ainsi que pour ne pas répéter inutilement les expériences de Delius et Kolle nous nous sommes adressés qu'à de petits animaux, et chez ceux-ci leur grande mortalité est souvent venue entraver nos recherches.

Il a fallu plusieurs expériences désastreuses pour nous convaincre qu'il faut espacer et espacer largement nos injections.

De plus nous avons déjà insisté sur la virulence variable du microbe. En injectant des quantités croissantes de microbes et des doses suivant une progression arithmétique assez lente, la virulence suivait tantôt la même progression, tantôt une progression géométrique tout à fait variable qui échappait à la réglementation.

Nous avons toujours fait précéder l'injection microbienne par une inoculation faite 24 heures d'avance, soit de bouillon, soit d'eau physiologique. Le bouillon ou l'eau physiologique exerce une action chimiotactique positive sur les

Chacun reçoit une culture âgée de 24 heures sur agar sanglant

7 fév. Tempér. 39°5	40°
8 — — 39°2	40°5
9 — — 39°5	39°9
24 fév. Poids 535 gr.	Poids 640 gr.
Temp. 38°7	Tempér. 39°4

Chacun reçoit 2 cultures Delius et Kolle âgées de 24 heures
24 mars Poids 570 gr. | Poids 650 gr.

Chacun reçoit 3 cultures Delius et Kolle dans le péritoine

Mouré le 24 avril.
Ne pèse plus que 390 gr.
Autopsie. Abscès de rate multiples. Deux grands abcès du foie, chacun du volume d'une noisette disposés du côté du bord libre du foie. Deux grosses tumeurs du volume d'une petite noisette dans l'épiploon. Ces tumeurs sont blanches, rondes, couvertes par l'épiploon, présentant une coque assez mince dont on brûle la surface ce qui permet la sortie à flots d'un pus caséux. L'ensemencement de ce pus reste stérile. De même l'ensemencement du sang. Toutefois l'examen des abcès de la rate permet d'apercevoir quelques microbes à l'intérieur des abcès. Toutefois ces microbes sont fortement gonflés, probablement ils ont subi un commencement de digestion. L'abcès du foie sur coupe ne montra pas de microbes.

22 — 33°2
23 — 33°2
24 — *Mouré.*

A l'autopsie on constate qu'il a beaucoup maigri. Ne pèse plus que 350 gr. A l'ouverture du péritoine on voit de nombreuses adhérences de l'intestin à la paroi et d'autres qui relient l'angle inférieur du foie à la paroi. De même dans la région de la rate, il faut sculpter dans cette région pour l'avoir. Les intestins paraissent ratatinés contre la colonne vertébrale. On voit de nombreux petits abcès dans la rate qui paraît augmentée de volume. Le foie est noirâtre et présente quelques petits points analogues aux fines granulations tuberculeuses. Les deux poulmons sont hépatisés. Le sang du cœur est coagulé. L'ensemencement des abcès de la rate et du sang du cœur reste stérile.

leucocytes, de sorte que ceux-ci sont très nombreux dans le péritoine au moment de l'arrivée des microbes. De cette façon la phagocytose est bien plus rapide et les chances de survie de l'animal sont considérablement augmentées.

Malgré ces précautions la mortalité de nos animaux en cours de vaccination fut véritablement effrayante.

Pour les cobayes nous sommes arrivés à en vacciner 9 sur une centaine d'animaux. Nous donnons plus loin le tableau de deux séries assez heureuses, parce que nous sommes arrivés à avoir 3 animaux vaccinés sur 20. Mais nous avons eu des séries où pas un animal n'a survécu (Voir tableau, *première série*, pages 86 et 87).

Sérum fourni par le cobaye n° 61

La saignée du cobaye n° 61 a été faite le 2 mai avec les tubes à saigner de M. Latapie. Le rendement en sérum par cette méthode (Latapie, *Annales Pasteur* 1899) est de beaucoup supérieur au rendement des tubes ordinaires. Par la méthode de Latapie, on a 75-80 0/0 de sérum, tandis qu'avec la méthode ordinaire on ne dépasse pas 50 0/0.

On saigne en même temps un cobaye neuf. Au bout de 24 heures le caillot est bien pris, le sérum bien pur, on le recueille et on fait un essai d'agglutination.

Essai d'agglutination. — On fait une émulsion d'une culture de microbe de Pfeiffer âgée de 24 heures sur sang gelosé, méthode de Delius et Kolle dans 5 c. c.

On dispose ensuite 4 petits tubes préalablement stérilisés et on met dans chacun trente gouttes de cette émulsion

Les 2 premiers tubes reçoivent :

Le 1^{er}, 30 gouttes d'émulsion de microbes :

1 goutte de sérum préventif

Le II^e, 30 gouttes d'émulsion de microbes :

3 gouttes de sérum préventif

Le III^e, 30 gouttes d'émulsion de microbes :

1 goutte de sérum normal

Le IV^e, 30 gouttes d'émulsion de microbes :

3 gouttes de sérum normal

L'agglutination est très nette au bout d'une heure dans le tube n° I. Au bout de deux heures elle est complète dans le tube, tandis qu'elle ne fait que commencer dans le tube n° II. Les tubes n° III et IV restent troubles. Il n'y a pas d'agglutination.

Pouvoir bactéricide. — On prend cinq petits tubes stériles. Dans chacun on met un centimètre cube de :

N° I.	I c. c. de sérum préventif.
N° II.	— — chauffé à 55°.
N° III.	— — normal.
N° IV.	— — normal, chauffé à 55°.
N° V.	— — d'eau physiologique.

Chacun des tubes reçoit 6 gouttes d'émulsion microbienne. (Une culture Delius et Kolle dans 2 c. c. cubes). Dès qu'on verse les microbes dans les tubes n°s I et II, il se fait une agglutination instantanée, une véritable précipitation. Au bout d'une heure, les tubes I et II sont complètement clairs; l'agglutination est complète on peut également le constater au microscope en goutte suspendue.

Après 4 heures de séjour à l'étuve on examine sur lamelle colorée :

Dans le tube n° I on voit quelques formes en boule, des formes normales rares, la plupart des microbes ont le pro-

toplasma mal coloré ou coloré inégalement et rejeté aux extrémités du microbe.

N° II. Formes en boule beaucoup moins nombreuses. La plupart sont en forme de navette.

N° III, IV, V. Formes habituelles, pas de formes en boule ni en navette.

24 heures après la mise à l'étuve, on fait un ensemencement avec chacun des tubes, tout en ayant soin de prélever avec la pipette dans le fond du tube.

L'examen des tubes ensemencés nous montre que seul le n° I n'a pas cultivé, les autres ont tous cultivés.

Action préventive du sérum

On prend un lot de 6 cobayes à peu près du même poids. Trois de ces cobayes reçoivent sous la peau du sérum préventif. Les trois autres reçoivent de la même façon du sérum normal.

Nous avons évité d'injecter du sérum, soit préventif, soit normal dans le péritoine. Des expériences antérieures nous avaient montré que si on fait une injection de bouillon, d'eau physiologique ou de sérum normal 24 heures d'avance dans le péritoine d'un cobaye, cette injection préserve l'animal d'une dose minime mortelle. C'est pour éviter cet élément de perturbation que nous nous sommes adressé à l'injection sous-cutanée.

Sérum préventif

<i>Cob. A</i>	<i>Cob. B</i>	<i>Cob. C</i>
520 gr. T. 39°1	628 gr. T. 38°2	595 gr. T. 37°9
3 mai. Reçoit 4 cc. sérum	3 cc. sérum	2 cc. sérum
préventif sous la peau	prév. sous la peau	prév. sous la peau
4 mai. T. 38°3	T. 38°	38°

Chacun reçoit à 9 heures et demie une culture Delius et Kolle, âgée de 24 heures dans le péritoine. Dose sûrement mortelle (déterminée *ad hoc*).

A 3 heures soir.	39°2	38°2	37°5
A 6 heures soir.	39°3	38°0	38°5
5 mai.	38°9	38°7	39°2
6 —	38°5	38°0	38°5
8 —	38°5	38°5	38°5
9 —	38°4	38°5	38°5
11 —	38°3	38°5	38°4
Poids	500 gr.	615 gr.	535 g.
1 ^{er} juin. Poids	550 gr.	700 gr.	520 g.

Sérum normal

<i>Cob. D</i>	<i>Cob. E</i>	<i>Cob. F</i>
475 gr., T. 38°5	540 gr., T. 39°1	T. 550 gr., 39°
3 mai, reçoit 4 cc. S. N.	3 cc. S. N.	2 cc. S. N.
en inj. sous cut.	en inj. sous cut.	en inj. sous cut.

4 mai. Chacun reçoit dans le péritoine une culture Delius et Kolle âgée de 24 heures.

T. à 9 heures et demie, avant l'injection :

	38°2	39°5	39°3
A 3 heures	37°5	36°2	35°1
A 6 heures	36°0	31°0	moribond
5 mai, matin	mort	mort	mort

Sang ensemené donne du microbe de Pfeiffer pur.

DEUXIÈME SÉRIE. — Immunisation des cobayes

Nous avons pris quinze cobayes de poids variables entre

450 gr. et 850 gr. On les a injecté le 25 décembre avec une culture Delius et Kolle âgée de 3 jours et tuée par la chaleur à 55°. Cette injection a été très bien supportée, Comme ils augmentent de poids, le 11 janvier, on leur fait une seconde inoculation après préparation du péritoine. Chacun d'eux reçoit un quart de culture sur gélose sanglante âgée de 48 heures. Le 23 janvier, ils paraissent bien portants, ils *augmentent de poids*, on se décide à leur faire une nouvelle inoculation. Pour ce faire, on les prépare 24 heures d'avance, en leur injectant 3 c. c. de bouillon stérilisé. Notre surprise fut grande lorsque le lendemain nous trouvâmes 12 cobayes sur 15 morts ou en train de mourir.

On fit l'autopsie des 8 cobayes sur 12 morts le 24 janvier, On constata une péritonite intense, avec une grande quantité de liquide dans le péritoine. Le liquide est un peu trouble et contient des grumeaux de pus en suspension. Sur la paroi abdominale fortement congestionnée, ainsi que sur l'épiploon et entre les anses intestinales, on voit des amas fibrineux, blancs, jaunâtres, de divers volumes, les plus grands de la dimension d'une pièce d'un franc, libres ou adhérents faiblement. Le plus grand nombre se trouvent sur l'épiploon, mais les plus gros sont logés entre la face inférieure du foie et l'estomac.

L'*examen* de l'exsudat péritonéal nous montra des mic. de Pfeiffer libres en nombre considérable, et peu de phagocytes, contenant très peu de microbes.

La *coupe* des grumeaux fibrineux nous montra qu'ils sont formés exclusivement de leucocytes polynucléaires en nombre considérable, agglutinés par des filaments fibrineux. Ces leucocytes contiennent peu de microbes à leur intérieur. Les leucocytes centraux en sont complètement dépourvus. Ce n'est que dans les polynucléaires périphériques qu'on peut en apercevoir un certain nombre.

Mais à la périphérie du grumeau il y a une couche fibreuse dans laquelle on aperçoit un nombre considérable de microbes. On dirait une véritable culture.

Le sang du cœur ensemencé nous donna du mic. de Pfeiffer pur.

On voit donc, d'après cet exemple nettement démonstratif que si le microbe de Pfeiffer est si fragile en dehors de l'organisme, au contraire dans l'organisme il est très résistant. Il présente une certaine analogie avec le microbe du rouget des porcs.

Par la suite nous avons réalisé expérimentalement ce qui nous arriva, sans le vouloir, dans le cas précédent. Un de nos cobayes de 700 gr., inoculé par une dose mortelle, résista et pendant sept jours présenta des microbes dans son péritoine. Ces microbes étaient tous phagocytés, mais vivants, puisque chaque jour on faisait un ensemencement qui nous donnait du microbe de Pfeiffer. Le septième jour, on lui fit le soir une injection de bouillon de 5 c. c. dans le péritoine. Le cobaye fut trouvé mort le lendemain matin, avec de nombreux microbes dans le péritoine. Mais, chose curieuse, l'ensemencement du sang resta stérile. Or, dans ce cas comme dans les cas précédents, nous avons déterminé la phagolyse des leucocytes contenant des microbes, qui mis en liberté, ont déterminé une péritonite suraigüe avec mort consécutive.

Chez les trois cobayes qui ont survécu ont fait une prise dans le péritoine 16 heures après l'injection de bouillon. On voit un exsudat très purulent, contenant de nombreux polynulcéaires phagocytés par des mononucléaires. Pas de traces de microbes, ni au microscope, ni à l'ensemencement. Les trois cobayes qui ont résisté présentent le tableau suivant :

	N ^o I	N ^o II	N ^o III
25 décembre .	715 gr.	670 gr.	600 gr.
11 janvier . .	740 gr.	680 gr.	620 gr.
23 janvier . .	760 gr.	700 gr.	600 gr.

Pas d'inoculations de microbes.

7 février . . .	740 gr.	720 gr.	680 gr.
-----------------	---------	---------	---------

Une culture Delius et Kolle de 24 heures, pour chaque cobaye.

14 mars. . . .	700 gr.	700 gr.	700 gr.
----------------	---------	---------	---------

Deux cultures de 24 heures pour chaque cobaye.

11 avril. . . .	610 gr.	740 gr.	680 gr.
-----------------	---------	---------	---------

Deux cultures et demie pour chaque.

7 mai	665 gr.	725 gr.	725 gr.
-----------------	---------	---------	---------

Trois cultures pour chaque.

18 mai	660 gr.	630 gr.	500 gr.
------------------	---------	---------	---------

Quatre cultures pour chaque.

5 juin, ne pèse plus que	470 gr.	620 gr.	575 gr.
--------------------------	---------	---------	---------

Six cultures pour chaque.

Le 10 juillet, meurt ; il ne pèse plus que 390 gr.

Autopsie du n^o I. — A l'ouverture du corps on constate que la surface du péritoine est rugueuse et dépolie. Dès qu'on ouvre le péritoine on est frappé par la présence de quatre tumeurs volumineuses, la plus grande du volume d'une noix, les autres plus petites, développées aux dépens du mésentère les autres aux dépens de l'épiploon. La rate est grosse et farcie de petits abcès. Gros abcès du foie du volume d'une petite noisette. Les intestins sont refoulés contre la paroi abdominale.

Les tumeurs de l'épiploon et du mésentère contiennent du pus caséeux, qui se montre stérile à l'ensemencement et à l'examen microscopique.

On injecte avec ce pus un cobaye pour voir si on n'a pas affaire à la tuberculose. Le cobaye reste indemne de toute lésion pendant des mois.

Les frottis de l'épiploon nous montrent quelques leucocytes contenant encore des vestiges de microbes.

L'examen du sang nous montre un grand nombre d'érythrocytes nucléés et une leucocytose intense portant surtout sur les polynucléaires.

L'ensemencement du sang reste stérile.

La coupe de l'abcès du foie nous montre autour de l'abcès une zone très hyperhémisée dans laquelle on voit un nombre considérable de petits mononucléaires, à protoplasma fortement basophile, et ressemblant beaucoup au plasma zellen d'Unna.

De plus, d'un côté de la périphérie de l'abcès, on voit une véritable prolifération canaliculaire présentant une certaine analogie avec la néo-formation qu'on rencontre dans la coccidiose des lapins.

Quant aux tumeurs épiploïques, on voit à la coupe qu'elles sont formées par des nombreux leucocytes poly et mononucléaires plus ou moins dégénérés, sans formation de cellule géante. La coque de cet abcès est formée par du tissu conjonctif fortement vascularisé. Autour des vaisseaux on voit une véritable infiltration de petits mononucléaires à protoplasma fortement basophile, à noyau se colorant de façon intense, analogues à ceux qu'on rencontre autour de l'abcès du foie.

Premier essai avec du sérum préventif

Le 25 juin on saigne à blanc les deux cobayes n° II et n° III pour obtenir du sérum préventif.

On prend un lot de huit cobayes : quatre sont injectés préventivement *sous la peau* avec du sérum préventif et quatre autres sont injectés de la même façon avec du sérum normal.

Sérum préventif

Cob. n° IV	Cob. n° V	Cob. n° VI	Cob. n° VII
—	—	—	—
420 gr.	390 gr.	325 gr.	325 gr.
38°2	38°9	39°2	38°

Le 26 juin chacun reçoit sous la peau du flanc 3 c. c. de sérum préventif, les deux premiers du n° II, les deux derniers du n° III.

Le 27 juin, à 9 heures et demie du matin, chacun reçoit dans le péritoine une culture virulente âgée de 24 heures (dose minima mortelle).

A 9 h. 1/2, avant in-

jection,	38°3	39°3	38°6	39°2
Midi	38°5	40°	40°	39°5
4 heures	39°	38°8	40°	39°
6 heures	38°	38°8	40°2	39°1
28 juin	39°	39°5	39°3	39°

Bien portants les jours suivants, augmentent de poids.

Sérum normal

Cob. n° VIII	Cob. n° IX	Cob. n° X	Cob. n° XI
—	—	—	—
390 gr.	385 gr.	350 gr.	375 gr.
38°4	39°	38°	38°3

Le 26 juin chacun reçoit sous la peau du flanc 3 c. c. de sérum de cobaye normal.

Le 27 juin chacun reçoit dans le péritoine une culture virulente (dose minima mortelle).

A 9 h. 1/2, avant injection

tion	38°6	39°	38°7	38°5
Midi.	36°1	38°5	36°	39°
4 heures	30°	36°5	31°	36°5

mourant

6 heures	mort	29°	mort	36°5
--------------------	------	-----	------	------

mourant

28 juin	mort			33°
-------------------	------	--	--	-----

29 juin. Ensemencement du sang du cœur

donne du mic. de Pfeiffer pur mort

Pour éviter les redites nous résumons :

Agglutination. — Agglutine à 1 pour 30.

Pouvoir bactéricide. — Plus marqué pour le sérum du n° II. Une anse de platine diluée dans 1 c. c. de sérum du II, et mis à l'étuve à 37° pendant 24 heures ne cultive plus si on l'ensemence.

Par contre, le sérum n° III est moins bactéricide.

L'ensemencement après 24 heures donne quelques colonies. Après 48 heures reste stérile. L'ensemencement avec des microbes (une anse de platine) ayant séjourné 48 h. à l'étuve à 37° dans du sérum normal de cobaye est au contraire fertile.

Sérum inoculé en même temps que la dose minima mortelle des microbes

Premier essai. — Avec le sérum immunisant du n° III on injecte en même temps, à 11 heures, trois cobayes dans le péritoine :

- 1° Cobaye A, reçoit 3 c. c. sérum immunisant du n° II.
- 2° Cobaye B, — — — normal de cobaye.
- 3° Cobaye C, — — — d'eau physiologique.

Cinq minutes après, chacun d'eux reçoit dans le péritoine 2 c. c. d'une émulsion de trois cultures Delius et Kolle âgées de 24 heures, émulsionnées dans 6 c. c. de bouillon.

1° Cobaye A, 350 gr., 38°5. — A 11 h. 20 on fait une prise dans le péritoine. Microbes nombreux. Pas de changement de forme. Pas de leucocytose.

A midi. — Les microbes sont nombreux, non agglutinés, la plupart présentent des formes habituelles. mais quelques-uns (rares) des formes en boule.

A 2 heures et demie, 37°5. — Microbes nombreux, non agglutinés. Quelques-uns présentent des vacuoles à leur intérieur, formes en boule plus nombreuses. Leucocytose plus intense. Polynucléaires peu nombreux et contenant peu de microbes.

A 4 heures, temp. 36°5. — Microbes très nombreux, non agglutinés. Toutefois la plupart sont en forme de coccus. On ne rencontre plus une seule forme allongée. Quelques formes en boule. Leucocytose très peu intense. Polynucléaires contenant peu de microbes.

A 6 heures, temp. 35°5. — Microbes nombreux. Ils se multiplient d'une façon manifeste.

On le retrouve mort le lendemain. Sur les frottis d'épiploon on peut constater une leucocytose intense mais dans le liquide péritonéal, il y avait toujours peu de phagocytes. Microbes très nombreux dans le péritoine.

L'ensemencement du cœur reste stérile,

2° Cobage B, 250 gr., temp. 39°.

11 h. 20. — Même chose que dans le cas précédent.

Midi. Microbes à forme habituelle, quelques formes en coccus (moins que dans le précédent). Pas de formes en boule. Phagocytose peu intense.

4 heures, temp. 36°5. Nombre de microbes considérable. La plupart en pseudo-diplocoques.

Phagocytose paraît plus intense que dans le cas précédent. Le nombre des phagocytes et le nombre des microbes phagocytes paraît être plus considérable.

6 heures, temp. 36°. Phagocytose assez intense, mais le nombre des microbes paraît augmenté.

Le lendemain matin on le retrouve mort.

L'ensemencement du sang du cœur est fertile.

2° Cobaye C. 275 gr., temp. 39°.

11 heures 20, l'aspect est le même que précédemment, quelques lymphocytes en plus.

Midi. Microbes à formes normales nombreux. Phagocytes nombreux. Toutefois le nombre des microbes tant libres que phagocytés est minime. Probablement la plupart doivent être sur l'épiploon.

4 heures, temp. 39°5. Plus de microbes libres. On voit quelques microbes à l'intérieur des leucocytes. Les leucocytes sont très nombreux, on ne peut comparer leur nombre à celui des cas précédents.

6 heures, temp. 39°. Phagocytes nombreux. On aperçoit à leur intérieur des vestiges de microbes.

Le lendemain et les jours suivants survie.

Deuxième essai. Avec le sérum immunisant du n° III.

On injecte *deux cobayes*, le premier avec un mélange de 3 c.c. de sérum immunisant et une culture de microbes de 24 heures ; le second avec 3 c.c. de sérum de cobaye normal et une culture âgée de 24 heures.

Cob. D 350 gr. T. 39°1.

11 heures. Reçoit dans le péritoine : 3 c.c. sérum immunisant + une cul. mic. de Pfeiffer.

11 heures 10. Microbes libres. Pas d'agglutination. Pas de lymphocytes. Pas de déformation de microbes.

Midi. Microbes libres. Pas d'agglutination. Pas de déformation. Pas de leucocytes.

2 heures. Microbes libres. Pas d'agglutination. Leucocytose minime. Quelques polynucléaires vides. Deux mastzellen.

4 heures. Microbes libres plus nombreux. Pas d'agglutination immédiate, elle se fait au bout de 5 minutes. Leucocytose minime et Phagocytose presque nulle. Quelques rares microbes à l'intérieur des leucocytes restent basophiles.

Cob. E 325 gr. T. 38°3

Reçoit dans le péritoine, 3 c.c. sérum normal + une cult. de mic. de Pfeiffer.

Microbes libres Pas d'agglutination. Quelques polynucléaires et nombreux lymphocytes.

Microbes libres. Pas d'agglutination. Phagocytose abondante et leucocytose *idem*.

Pas d'agglutination. Microbes libres très nombreux. Leucocytose et phagocytose très active. Microbes à l'intérieur des phagocytes prennent l'éosine.

6 heures. Temp. 38°5. —	Temp. 37°. — L'animal
L'animal a l'air souffrant.	souffre. Microbes libres nom-
Microbes libres nombreux.	breux. Leucocytose et phago-
Leucocytose et phagocytose	cytose active.
minime.	

Le lendemain matin mort.	Le lendemain matin, 33°.
Sangensemencé stérile. Bien	L'animal mourut dans la
que le péritoine fut rempli	soirée. Sangensemencé fer-
de microbes.	tile.

En résumé, voici les résultats de la vaccination des cobayes :

1° On peut immuniser activement, aux prix de grands sacrifices, des cobayes. Ces cobayes résistent à des doses plusieurs fois mortelles (12 fois).

2° Le sérum des animaux immunisés à :

a) Un pouvoir agglutinant I : 30

b) Un pouvoir bactéricide *in vitro*

c) Un pouvoir préventif, lorsqu'on l'injecte 24 heures d'avance.

d) Par contre lorsqu'on l'injecte en même temps que les microbes, le sérum des animaux immunisés non seulement ne préserve pas les animaux inoculés de la mort mais au contraire on dirait qu'il favorise l'infection.

Les expériences précédentes furent répétées encore une fois avec le sérum d'un cobaye immunisé. Comme elles sont à tous points confirmatives des précédentes nous croyons inutile de les donner. Nous avons cherché à établir ces faits d'une façon précise avant d'aller à la recherche d'autres faits nouveaux.

Immunisation des lapins

L'immunisation des lapins nous aurait donné moins de déboires si la maladie du nez ne s'était pas mise de la partie.

Sur les 15 lapins que nous avons commencé à immuniser, nous sommes tout de même parvenus à en immuniser trois. Nous en avons perdu une demi-douzaine vers la fin du mois de septembre par la maladie du nez.

Nous croyons inutile de donner la marche de la température chez les lapins vaccinés. Chez les lapins comme chez les cobayes, si la dose de microbes est au-dessous de la limite, l'animal réagit par la fièvre, qui peut atteindre chez le premier 42°. Par contre si la dose microbienne est à la limite ou au-dessus, l'animal fait de l'hypothermie, quelque soit son degré de vaccination. Il peut baisser jusqu'à 33° et se remettre, mais le plus souvent lorsque la température est si basse le lapin finit par mourir.

Voici le cas d'un des lapins qui a survécu :

Lapin n° 45, châtré. Pèse 2590 gr.

24 mai reçoit dans le péritoine deux cultures âgées de 3 jours et tuées à 55° pendant une demi-heure.

10 juin, 2.700 gr. reçoit 6 cultures tuées à 55°.

20 juin 2.750 gr. reçoit une culture âgée de 3 jours.

1^{er} juillet, 2.700 gr. 1/4 de boîte de Roux, méth. Delius et Kolle. Culture âgée de 3 jours.

15 juillet 2 350 gr. 1/4 de boîte de Roux, méth. Délius et Kolle. Culture âgée de 24 heures.

1^{er} août 2.500 gr. 1/2 boîte de Roux. Culture de 42 heures.

24 août. 2.350 gr. Une boîte de Roux. Culture de 24 heures.

24 septembre, 2 500 gr. Une boîte de Roux. Culture de 24 heures.

On le saigne le 4 octobre. On lui retire 40-50 c.c. de sang, on lie la carotide, on suture la peau du cou, et on le laisse au repos pendant une quinzaine de jours pour lui laisser le temps de se remettre.

Agglutination. — On prend 4 cultures, méthode Delius et Kolle, âgés de 24 heures. On les émulsionne dans 10 c.c. d'eau physiologique. On centrifuge et on décante deux fois pour avoir une émulsion bien homogène. On prend 12 petits tubes stériles, on met dans chaque tube 40 gouttes d'émulsion microbienne. Les 10 premiers tubes sont additionnés de quantités progressivement croissantes de sérum de lapin immunisé (L. Imm.) les 6 derniers, avec du sérum de lapin normal (L. Norm.) :

I.	40 gouttes émuls. microb.	+	1 goutte sérum L. Im.	
II.	—	+	2	—
III.	—	+	3	—
IV.	—	+	6	—
V.	—	+	10	—
VI.	—	+	12	—
VII.	—	+	1	— L. Norm.
VIII.	—	+	2	—
IX.	—	+	3	—
X.	—	+	6	—
XI.	—	+	10	—
XII.	—	+	12	—

Ainsi préparés on met tous ces tubes à l'étuve à 37°.

Au bout d'une demi-heure on voit apparaître des gru-

meaux dans le tube n° I, un peu moins dans II et III. Rien dans IV, V et VI. Rien dans les tubes à serum normal.

Au bout d'une heure, l'agglutination est complète dans I et II, un peu moins dans III, elle se dessine dans IV, rien dans V et VI. Rien dans tubes témoins.

Au bout de 4 heures, l'agglutination est complète dans les cinq premiers tubes. Il n'y a pas d'agglutination dans le tube VI ni dans les tubes témoins.

Nous assistons à ce fait paradoxal que moins il y a de serum agglutinant plus l'agglutination se fait vite. Quand le serum agglutinant est en quantité assez considérable 12 pour 40 l'agglutination ne se fait pas.

Nous avons consulté sur ce fait notre ami le docteur Besredsky qui a une haute compétence dans ces questions : il nous a affirmé avoir souvent remarqué le même fait.

Pouvoir bactéricide. Dans 2 c.c. de serum de lapin immunisé on verse deux gouttes d'une émulsion microbienne, méthode Délius et Kolle mélangée avec 2 cc. d'eau physiologique. On fait un témoin dans les même conditions mais avec 2 c. c de serum de lapin normal.

On met à l'étuve pendant 24 heures et on ensemence sur gélose sanglante ensuite.

Le tube avec serum de lapin immunisé et microbes ne donne rien ; le tube avec serum normal et 2 gouttes d'émulsion microbienne donne une culture de b. de Pfeiffer pur.

Action préventive. On prend un lot de 8 cobayes, qu'on divise en deux séries de 4. La première série de quatre reçoit en *injection sous-cutanée*, 4 c. c. de serum de lapin immunisé pour chaque cobaye.

La seconde série reçoit 4 c.c. de serum de lapin normal, pour chaque cobaye par la même voie.

PREMIÈRE SÉRIE. — *Sérum lapin immunisé* (L.Imm.)

Cob. n° 18	Cob. n° 77	Cob. n° 29	Cob. n° 70
—	—	—	—
615 gr.	390 gr.	580 gr.	580 gr.
38° 5	39°	38° 2	38°

5 octobre à 11 h. chacun reçoit 4 c.c. serum L. I. en injection sous-cutanée.

6 octobre à 9 h.. 40° 2 40° 5 41° 0 40° 0

Au niveau de l'injection sous-cutanée, boule d'œdème. On fait une prise et on ne constate qu'un œdème séreux sans leucocytes.

Chacun reçoit dans le péritoine 1/2 culture Delius et Kolle (dose mortelle minima).

6 heures du soir.	35° 2	34° 5	35° 2	35° 1
7 octobre matin.	37°	36°	37°	
— soir.	37°	37°	37° 9	33°
8 —	39°	38° 5	38° 5	33°
9 —	38° 5	38° 5	38° 2	31°
11 —	Bien portants		mort.	
1 novembre	Bien portants		ensemencement	
			du sang	
			reste stérile	

DEUXIÈME SÉRIE. — *Sérum lapin normal* (S. L. Norm.).

Cob. n° 29	Cob. n° 67	Cob. n° 6	Cob. n° 65
—	—	—	—
420 gr.	616 gr.	540 gr.	420 gr.
38° 5	39°	39° 9	38° 2

5 octobre chacun reçoit 4 c. c. serum L. Norm. en injection sous-cutanée.

6 octobre	. .	38° 5	39° 1	38° 5	38° 5
-----------	-----	-------	-------	-------	-------

Chacun reçoit dans le péritoine 1/2 culture Delius et Kolle (dose minima mortelle).

6 octobre soir	. .	mort	35° 1	31°	36° 1
----------------	-----	------	-------	-----	-------

7	—		mort	mort	33° 9
---	---	-----------	------	------	-------

8	—	. .	Mic. de Pfeiffer dans le sang		33° 9
---	---	-----	-------------------------------	--	-------

9	—				mort
---	---	-----------	--	--	------

Nous croyons utile d'ajouter que pour être exact dans la distribution des microbes on procède de la façon suivante : on émulsionne les quatre cultures dans 16 c.c. de bouillon et chaque animal reçoit 2 c.c. de émulsion. De cette façon la distribution est égale et on n'a pas à compter avec les dimensions des tubes d'agar sanglant qui sont variables.

Dans l'expérience précédente on a pu voir à la suite de l'injection du sérum préventif la formation d'une boule d'œdème et une élévation de température. Nous croyons donc que dans ce cas le sérum est toxique et que nous avons saigné trop tôt après la dernière injection.

Essai de sérum et de microbes injectés en même temps

8 octobre. On prend deux cobayes.

L'un de 440 gr. reçoit à 9 heures du matin dans le péritoine 4 c. c. de sérum immunisant. 5 minutes après reçoit 3/4 de culture microbienne âgée de 24 heures.

Témoin. 400 gr. Reçoit en même temps 4 c. c. de sérum de lapin normal, puis 5 minutes après 3/4 de culture microbienne âgée de 24 heures.

(Dose un peu supérieure à la dose minima mortelle).

Prise péritonéale 10 m. après. Microbes nombreux ayant l'air de souffrir, la plupart ayant le protoplasma rejeté aux deux extrémités. Formes rondes nombreuses. Pas d'agglutination. Pas de lymphocytes.

15 m. après. Microbes libres non agglutinés. Quelques leucocytes mono et poly-nucléaires.

1 heure après. Leucocytes nombreux. Microbes ont complètement disparu. Les leucocytes ayant phagocyté sont plus nombreux.

2 heures après. Plus de microbes libres. Exsudat franchement purulent. Les polynucléaires contiennent peu de microbes. Probablement les microbes doivent se trouver sur l'épiploon.

3 heures après. 36° 5.

9 heures après. 35° 5. Plus de microbes visibles même à l'intérieur des phagocytes. L'exsudat est épais, fortement purulent. L'animal a l'air très malade.

Microbes libres nombreux. Pas de leucocytes.

Microbes libres. Pas de leucocytes.

Microbes libres nombreux. Leucocytes moins nombreux mais contiennent beaucoup plus de microbes.

Microbes libres nombreux. Quelques leucocytes bourrés de microbes. Pas d'agglutination.

36°.

32°.

9 octobre. matin. 35° Mort.
10 octobre. — 34° L'ensemencement du sang
donne du microbe de Pfeiffer
pur.

11 octobre. — 34°
12 octobre. — mort.

Exsudat très purulent dans
le péritoine. Ensemence-
ment de l'exsudat et du sang
reste stérile.

DEUXIÈME SÉRIE. — *Epreuves avec sérum de lapin*
immunisé (L. Imm.)

Ce sérum provient d'un lapin en cours d'immunisation
depuis longtemps.

Voici le traitement qu'il a subi :

Lapin (N° 5) 1930 gr.

Le 1^{er} février, reçoit dans les veines une culture âgée de
24 heures tuée par la chaleur à 55°.

Le 2 février, 1940, 2 cultures tuées par la chaleur à 55°.

Le 15 mars, 1850, 4 cultures tuées par la chaleur à 55°.

Le 15 avril, 1700, une culture vivante âgée de 24 heures.

Le 10 mai, ne pèse plus que 1300 gr. A l'air profondé-
ment malade; on lui fait des injections sous-cutanées de
sérum artificiel, on le met dans une cage dehors et on veille
à son alimentation.

Le 15 juillet, 1700 gr., reçoit une culture virulente âgée
de 24 heures dans le péritoine.

Le 13 août, 1800 gr., reçoit 3 cultures virulentes dans le
péritoine.

Le 30 août, 1750 gr., reçoit dans le péritoine un quart de
boîte de Roux âgée de 24 heures.

Le 10 septembre, 1600 gr., reçoit dans le péritoine une demi-boîte de Roux âgée de 24 heures.

Le 10 octobre, 1500 gr., reçoit une boîte entière de Roux méthode Délius et Kolle, âgée de 24 heures dans la veine, de l'oreille. L'animal est gravement malade. La température tombe à 35°. Cet état dure à peu près 7 jours, puis l'animal commence à se remettre. Toutefois il est dans un état de déchéance considérable. La cachexie est telle que 20 jours après la dernière injection, on se décide à le saigner à blanc. On fait l'autopsie ensuite. Cette autopsie est intéressante, parce qu'elle peut servir de type, aux nombreuses autopsies que nous avons faites chez les lapins en cours de vaccination et morts en suite. Chez le lapin on constate d'une façon régulière ce qu'on constatait chez le cobaye d'une façon exceptionnelle. Nous voulons parler de la réaction par abcès. Cette réaction est habituelle chez le lapin à tel point que Kruse a cru qu'elle était caractéristique chez cet animal (1).

Nous avons vu qu'on rencontre assez fréquemment cette lésion chez le cobaye.

A l'ouverture du péritoine de notre lapin, on constate un abcès sous-cutané, noté depuis le 10 septembre. Il provenait de ce qu'en retirant ma seringue du péritoine j'ai injecté une certaine quantité d'émulsion microbienne dans le tissu sous-cutané. Cet abcès sous-cutané a persisté pendant presque deux mois en diminuant très lentement mais ne s'ulcérant pas. On fait un ensemencement avec le pus caséux de cet abcès.

A l'ouverture du péritoine, on constate un grand nombre de petites granulations, allant du volume d'un grain de mil, jusqu'au volume d'une noisette, et recouvrant le

1. Kruse *Deutsch Med. Woch.* 1896.

péritoine pariétal, l'épiploon, le mésentère et même sur certains points de l'intestin grêle. La plus grosse de ces tumeurs est ensemencée.

La rate est considérable, sa surface est très rugueuse. Le foie est noirâtre et adhère fortement à la paroi.

Le poumon droit est transformé en un bloc compact, ne s'affaisse pas à l'ouverture du thorax et s'effrite lorsqu'on cherche à le saisir avec la pince. L'autre poumon a l'air normal vers la base mais le sommet dur et scléreux à la coupe.

Du côté des os on a remarqué depuis longtemps un trouble trophique curieux : Les deux fémurs sont très augmentés de volume vers leur milieu où ils sont 5-6 fois plus gros que d'habitude. On dénude le fémur et on voit une hypertrophie considérable du tissu osseux. La cavité médullaire n'était pas augmentée de volume et dans la moelle on trouvait de nombreuses coquilles osseuses. L'ensemencement du sang et de la moelle resta stérile.

Par contre l'ensemencement de l'abcès sous-cutané ainsi que celui de la tumeur mésentérique nous donne du microbe de Pfeiffer à l'état pur. Comme nous n'avons pas fait d'injection intra-pétoneale depuis presque deux mois nous croyons que le microbe s'y trouvait déjà depuis lors à moins que par suite de l'injection intra-veineuse faite il y a 20 jours les microbes ne s'y soient logés comme dans des bouillons de culture. Quoi qu'il en soit les microbes provenant de cet abcès, injectés à une grande dose (deux cultures à un cobaye de 450 grammes le laisse indemne. Il était donc complètement dépourvu de virulence.

Le sérum fourni par le lapin, se montre excellent, comme on pourra le voir. Des 4 lapins vaccinés et dont le sérum fut expérimenté c'est certainement son sérum qui fut le meilleur.

Essai d'agglutination. — Sans plus insister sur les détails nous dirons que ce sérum était agglutinatif au bout d'une heure à 1 pour 80. Trois gouttes de ce sérum agglutinent au bout de deux heures un tube entier de culture émulsionnée dans 6 c. c.

Pour ce sérum ainsi que pour les deux autres dont nous ne parlerons pas en détail, nous avons constaté, d'une façon régulière, l'agglutination par des petites quantités de sérum et l'absence d'agglutination lorsque le sérum était un peu plus abondant.

L'agglutination se fait dans les mêmes proportions, peut-être un peu moins vite lorsqu'on emploie du sérum chauffé à 55° pendant une demi-heure.

Pouvoir bactéricide. — Pour le constater, on emploie la même méthode que nous avons décrite précédemment. Ce pouvoir bactéricide est peu marqué au bout de 24 heures. Il n'est complet qu'au bout de 36 heures.

Essai sur les animaux. — Nous nous assurons d'abord si le sérum est préventif. On injecte dans le tissu sous-cutané d'un cobaye, deux c. c. de sérum préventif. On fait un témoin avec du sérum normal. Douze heures après on injecte l'un et l'autre avec une dose minima mortelle. Le témoin meurt au bout de 9 heures. Le cobaye injecté avec le sérum préventif résiste. Nous nous sommes assuré de cette façon du pouvoir préventif. Nous avons voulu voir quelle est l'action du sérum sur les animaux qu'on injecte en même temps que les microbes.

On prend 5 cobayes : chacun reçoit dans le péritoine une dose décroissante de sérum : 4 c. c. ; 3 c. c. ; 2 c. c. ; 1 c. c. ; 1/2 c. c. Nous avons fait cette expérience à doses décroissantes parce que de nombreuses expériences antérieures nous avaient montré ce résultat vraiment paradoxal signalé déjà par Loeffler et Abel que plus la dose de sérum est

grande, moins les chances de survie de l'animal sont probables.

Notre ami le Dr Loris Mélikoff a remarqué le même fait d'une façon indépendante de nous. Il poursuit dans le laboratoire de M. Metchnikoff la solution de ce problème.

Voici le tableau des cobayes injectés à doses décroissantes :

Cob. n° 3	n° 46	n° 10	n° 11	n° 20
—	—	—	—	—
530 gr.	485 gr.	350 gr.	390 gr.	400 gr.
38°1	39°	39°	38°7	38°5

chacun reçoit à 10 heures du matin dans le péritoine :

4 c. c.	3 c. c.	2 c. c.	1 c. c.	1/2 c. c.
S. Prév.	S. Prév.	S. Prév.	S. Prév.	S. Prév.

5 minutes après chacun reçoit 1/2 culture (dose un peu supérieure à la dose minima mortelle).

Température :

2 heures.	36°0	39°0	40°0	40°1	40°5
4 —	35°5	39°5	39°0	39°0	39°2
6 —	35°0	39°0	39°2	39°0	39°1

D'après la marche de la température on peut voir que c'est celui qui a reçu le plus de sérum qui est le plus malade. Toutefois il se remet lentement (il ne commence à manger que le troisième jour). Au bout de la semaine tous sont bien portants.

Nous donnons plus loin l'observation des témoins de l'expérience précédente.

Nous n'avons fait que deux témoins, avec les doses extrêmes :

Cobaye n° 53 *Cobaye n° 31*

615 gr. Temp. 38°7	550 gr. Temp. 39°
Reçoit à 10 h. dans	Reçoit 1/2 c. c.
le péritoine 4 c. c.	de sérum
de sérum normal	normal de
de lapin	lapin

5 minutes après chacun reçoit une demi-culture de microbe (l'émulsion microbienne est toujours commune aux vaccinés et aux témoins).

2 heures	37°2	35°5
4 heures	33°1	33°2
6 heures	29°0	mort

Le lendemain matin on le trouve mort. Le sang ensemençé donne du microbe de Pfeiffer pur.

Essai avec du sérum chauffé

On chauffe le sérum préventif pendant une demi-heure à 55°. On fait la même chose avec du sérum de lapin normal.

On injecte deux cobayes avec du sérum préventif chauffé et on fait deux témoins avec du sérum normal chauffé.

Cob. n° 35 *Cob. n° 54*

525 gr., 39°2 505 gr., 39°1

Chacun reçoit à 9 heures 1/2 du matin dans le péritoine.

4 c. c. S. Prév.	3 c. c. S. Prév.
chauffé	chauffé

midi.	36°5	37°2
4 heures	35°9	37°1
6 heures	36°9	37°5

Le lendemain les 2 sont bien portants, mangent avidement.

<i>Cob. n° 15</i>	<i>Cob. n° 19</i>
—	—
600 gr., 38°9	575 gr., 37°9

chacun reçoit dans le péritoine à la même heure :

4 c. c. S. Norm.	3 c. c. S. Norm.
chauffé	chauffé

5 minutes après chacun reçoit 1/2 culture virulente.

midi.	37°1	36°9
4 heures	36°5	35°0
6 heures	33°1	mort.

mort le lendemain.

Nous n'avons pas eu assez de sérum pour étudier d'une façon systématique, le sort des microbes lorsqu'on en injecte en même temps que le sérum.

Mais comme il nous restait 5 c. c. de sérum de lapin immunisé, nous avons décidé d'étudier ce que deviennent les microbes lorsqu'on les injecte à des cobayes qui ont reçu 24 heures d'avance du sérum préventif.

Nous avons injecté 5 c. c. sous la peau des deux cobayes n° 62 et n° 78. Nous avons fait deux témoins injectés sous la peau avec la même quantité de sérum normal.

Cob. 62	Cob. 78	Cob. 88. Témoin	Cob. 91. Témoin
—	—	—	—
520 gr., 38°9	560 gr., 39°	560 gr., 39°2	550 gr., 38°5
Chacun recoit 2 c. c. 1/2		Chacun reçoit 2 c. c. 1/2	
de S. Prév. sous la peau.		de sérum normal sous la	
		peau.	
24 heures après chacun reçoit une demi-culture virulente.			

A 11 heures du matin :

39°1	39°7	39°5	39°1
Midi temp. 37°5	37°9		
Phagocytose abondante.		Microbes libres. Pas de	
Microbes libres.		leucocytes. Quelques leuco-	
		cytes seulement.	

2 h. temp. 37°1	36°9		
Phagocytose intense		Microbes libres. Quelques	
sans microbes libres.		phagocytes.	

4 h. temp. 36°3	36°5	35°4	35°2
Phagocytose		Beaucoup de microbes li-	
intense.		bres. Phagocytose peu in-	
		tense.	

On aperçoit sur toute la
préparation 2-3 microbes
libres.

6 h. temp. 38°5	37°9	33°1	34°5
Tous les microbes à l'in-		Beaucoup de microbes li-	
térieur des phagocytes.		bres. Phagocytose peu in-	
Plus de microbes libres.		tense.	

Le lendemain

matin.	40°	mort	mort
--------	-----	------	------

On sacrifie à 6 heures le cobaye n° 62.

On constate une péritonite purulente manifeste. On ensemence les organes et on constate que l'exsudat péritonéal a cultivé malgré que tous les microbes se trouvaient à l'intérieur des leucocytes. L'épiploon de même. Mais l'ensemencement du sang et des organes reste stérile.

Le lendemain matin (24 heures après l'injection) on sacrifie l'animal n° 78.

L'exsudat péritonéal très purulent nous montre des macrophages en train de dévorer des microphages. On n'aperçoit plus de traces de microbes ni dans l'exsudat ni dans

l'épiploon. L'ensemencement de ces organes ainsi que l'ensemencement du sang, du cerveau, de la rate et de la moelle osseuse reste stérile.

D'après ce qui précède, on a pu voir que chez les animaux injectés préventivement, 24 heures d'avance, sous la peau, nous ne voyons pas de destruction microbienne extracellulaire. La destruction se fait d'une façon systématique. On remarquera, si on veut se reporter quelques pages plus haut, qu'il y a une évidente analogie entre la destruction des microbes chez les cobayes injectés préventivement et la destruction des microbes dans l'immunité naturelle, lorsqu'on injecte les animaux avec des doses faibles, non mortelles.

Quant à la destruction des microbes injectés en même temps que le sérum, nous ne saurons affirmer si elle se passe de la même façon. Le manque de sérum ne nous a pas permis de faire cette étude.

Quant aux essais curatifs, le résultat a été nul. Nous avons essayé d'injecter le sérum deux heures et une heure après les microbes. Nous n'avons pas pu préserver l'animal de la mort.

CONCLUSIONS

De nos recherches il résulte que :

1^o Utilisant la propriété chimiotactique négative de l'acide lactique, nous avons exalté la virulence du coccobacille de Pfeiffer et nous avons pu provoquer une septicémie expérimentale chez les animaux de laboratoire.

2^o Cette septicémie expérimentale par voie intra-péritonéale ou intra-veineuse tue le cobaye, le lapin et la souris au bout de 6-24 heures. Les animaux succombent à une péritonite intense avec hypothermie. Certains organes et le sangensemencés suivant le procédé que nous avons décrit, montrent des cultures pures de bacilles de Pfeiffer.

3^o Toutefois le microbe garde ses caractères de microbe essentiellement toxique. Les quelques animaux qui ont échappé à l'infection finissent par succomber au bout de 10-15 jours, en proie à une cachexie intense qui leur fait perdre presque la moitié de leur poids. Chez ces animaux, il n'est pas possible de déceler la présence du microbe dans le sang ni dans les organes.

Les microbes englobés par les leucocytes ont été complètement digérés mais ils continuent d'agir par leurs toxines.

Toutefois dans certains cas, rares il est vrai, 8 o/o dans notre statistique, l'organisme se défend en formant de véritables abcès autour des microbes, surtout dans le foie et la rate. Si la plupart de ces abcès se sont montrés stériles

à l'ensemencement, il est tout de même possible de constater sur des coupes d'organes la présence de microbes en voie de digestion, à l'intérieur des leucocytes centraux de ces abcès.

4° Nous avons refait les expériences de Cantani qui confirment l'idée que le cocco-bacille de Pfeiffer est surtout un microbe toxique. Nous avons pu vérifier les expériences de cet auteur et constater avec lui que l'injection intra-cérébrale de faibles doses de microbes vivants ou tués par la chaleur à 56°, provoque la mort des animaux au bout de 8 à 24 heures.

5° Nous avons essayé d'immuniser activement des animaux ; d'abord avec des microbes tués, ensuite par des doses progressivement croissantes de microbes vivants et virulents, nous sommes parvenu à avoir des animaux (cobayes et lapins) qui résistaient à une dose 12 fois mortelle.

6° Les animaux fortement immunisés par ces doses progressivement croissantes de microbes ont été saignés 3 à 4 semaines après la dernière injection.

Le sérum de ces animaux montrait les propriétés suivantes :

α. Sérum des cobayes immunisés. — 1° Agglutine dans la proportion de 1 à 30 au bout de 1 heure de séjour à l'étuve à 37°.

Les tubes témoins n'agglutinent pas.

2° L'agglutination se fait à peu près dans les mêmes proportions mais seulement au bout de 2 heures avec le sérum chauffé à 56° pendant une demi-heure.

3° Le sérum des animaux immunisés était bactéricide au bout de 24 à 36 heures de séjour à l'étuve à 37°.

4° Ce sérum, injecté préventivement, à un lot de 4

cobayes (de 400-500 gr.), injection sous-cutanée faite 24 heures d'avance, préservait ces animaux de l'injection intra-péritonéale d'une dose mortelle de microbes. Tandis que 4 témoins, préparés dans les mêmes conditions, mais avec du sérum normal, succombaient au bout de 6 à 8 heures.

5° Injectant le sérum en même temps ou après la dose mortelle de microbes, nous ne sommes pas arrivé à préserver nos animaux.

β. Sérum des lapins immunisés. — Ce sérum nous donne des résultats calqués sur les précédents à quelques différences près.

1° Le pouvoir agglutinatif de ce sérum est bien plus marqué que celui du cobaye.

Il agglutine au 1/80 au bout d'une heure à l'étuve. L'agglutination ne se fait pas lorsque la quantité de sérum est grande (12 à 40 n'agglutine pas ou très peu après 4 à 5 heures).

L'agglutination se fait aussi, mais demande un peu plus de temps avec le sérum chauffé pendant une demi-heure à l'étuve à 55°.

2° Le pouvoir préventif est aussi prononcé que celui du sérum de cobaye immunisé.

3° Si on l'injecte à petites doses, en même temps qu'une quantité mortelle de microbes, il préserve l'animal de la mort. Même résultat avec sérum chauffé à 55°. Mais si la quantité de sérum est grande (4 à 5 c. c.) il ne préserve plus l'animal de la mort provoquée par la même quantité de microbes (résultat paradoxal de Loeffler et Abel).

4° L'injection du sérum une heure après celle des microbes ne préserve pas l'animal de la mort.

Nous avons donc obtenu — utilisant la virulence pro-

gressivement croissante du microbe par le passages — un sérum doué d'un pouvoir préventif considérable, mais non curatif.

Travail de laboratoire de M. Metchnikoff de l'Institut Pasteur.

VU : *le Président,*
D^r A. CHANTEMESSE.

VU : *Le Doyen,*
BROUARDEL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

